

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Efecto de la terapia antimicrobiana frente a biofilms duales
de *Mycobacterium abscessus* y *Pseudomonas aeruginosa***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Graciela Rodríguez Sevilla

DIRECTORES

Jaime Esteban Moreno

María Luisa Gómez-Lus Centelles

María Concepción Pérez-Jorge Peremarch

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Efecto de la terapia antimicrobiana frente a *biofilms* duales
de *Mycobacterium abscessus* y *Pseudomonas aeruginosa*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Graciela Rodríguez Sevilla

DIRECTORES

Jaime Esteban Moreno, María Luisa Gómez-Lus Centelles y

María Concepción Pérez-Jorge Peremarch.

Madrid, 2020

GRACIELA RODRÍGUEZ SEVILLA

TESIS DOCTORAL

Efecto de la
terapia
antimicrobiana
frente a biofilms
duales de
*Mycobacterium
abscessus* y
*Pseudomonas
aeruginosa*

DIRIGIDA POR

**JAIME ESTEBAN MORENO
MARÍA LUISA GÓMEZ-LUS CENTELLES
MARÍA CONCEPCIÓN PÉREZ-JORGE PEREMARCH**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



Agradecimientos

En primer lugar, gracias a mis directores por llevarme de la mano en este proceso. Gracias al Dr. Esteban por su gran capacidad docente, su infinita paciencia, su eficacia y sus palabras de ánimo en los momentos difíciles. Gracias a la Dra. Pérez-Jorge por confiar en mí para legarme sus estudios con *biofilms* multiespecie y guiarme en el desarrollo de esta investigación, por las largas charlas debatiendo los resultados, y por su habilidad para simplificar todos los problemas hasta hacerlos sencillos. Gracias a la Dra. Gómez-Lus por su eterna disponibilidad y capacidad de gestión, así como por todas sus aportaciones, que sin duda dan valor al trabajo que hoy presento. Asimismo, gracias a mi tutora, la Dra. Folgueira, porque siempre ha estado atenta a mis necesidades.

Este trabajo se desarrolló durante mi etapa como residente en la Fundación Jiménez Díaz. Gracias a los Facultativos Especialistas del Servicio de Microbiología Clínica, los Dres. Gadea, Fernández Roblas, Esteban, Zapardiel, y la Dra. Pérez-Jorge, por enseñarme la que hoy es mi profesión, por inculcarme la importancia de una carrera investigadora y por facilitar siempre su desarrollo. Gracias a mis “resis” mayores y pequeños, Moncho, Cuca, María, Mari, Marta, Iris, Laura, Marta y Alicia, por guiarme y ayudarme durante toda la etapa de formación, por tantos desayunos juntos, tantos ratos en la salita, y tantas anécdotas inolvidables tanto dentro como fuera del hospital. Gracias también a todos los técnicos de la FJD por su eterna disposición y su compañerismo. En especial, gracias a África y Esther por tantos Middlebrook, tanto autoclave, y tantos pases y antibiogramas de mis micobacterias. En definitiva, gracias a todos por hacer de los 4 años de residencia una de las más bonitas etapas.

Parte de esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin mis compañeros de investigación, los ya doctores John y David que, además de hacer que el tiempo en investigación fuera mucho más ameno, hicieron parte de los experimentos cuando yo estaba fuera. Gracias de todo corazón.

Aproximadamente la mitad de la tesis está basada en los estudios que hice en la Universidad de Gante, bajo la dirección del Dr. Tom Coenye y la Dra. Aurélie Crabbé. Gracias a ambos por haberme enseñado las herramientas para el desarrollo y la interpretación de mis estudios, y por haberme hecho entender mejor los diferentes factores que pueden influir en la respuesta a antimicrobianos. Gracias a Eva, a Charlotte y a Lisa, que me ayudaron en todo momento a sacar adelante el trabajo experimental. Sin duda, habéis sido un pilar fundamental en este trabajo. Por último, gracias a la Sociedad Española de Microbiología por haber contribuido económicamente para la realización de la estancia con una beca SEIMC.

Gracias a toda mi familia por los ánimos recibidos durante este proceso. Gracias, mamá y papá, por haberme dado todas las oportunidades con las que muchas personas sueñan. Gracias por escucharme y vivir esta etapa como si la estuvierais viviendo vosotros mismos, y por recoger parte de la carga cuando todo era demasiado para mí.

Gracias a mis amigos, que han tenido conmigo una paciencia infinita y, además, ya saben perfectamente lo que es un *biofilm*. ¡Eso sí que es amor!

Gracias Dani, que apareciste en mi vida justo para vivir de cerca todo el desarrollo de este trabajo. Gracias por acompañarme por la geografía española (y por el extranjero) para apoyarme en mi carrera. Espero algún día poder devolverte todo lo que me has dado. Juntos somos imparables.

Índice

Resumen	13
Summary	19
Introducción	25
La enfermedad pulmonar en fibrosis quística	28
1. Fibrosis quística: generalidades	28
2. Proteína CFTR: funcionamiento y mutaciones	28
3. Patogénesis de la enfermedad pulmonar	30
4. Microbiota del ecosistema pulmonar	32
i. Visión tradicional	32
ii. Nuevas perspectivas	35
Infección pulmonar por <i>Mycobacterium abscessus</i> en fibrosis quística	36
1. La especie <i>Mycobacterium abscessus</i>	36
i. Factores de patogenicidad relevantes en fibrosis quística	38
2. Epidemiología	40
3. Manifestaciones clínicas y diagnóstico	42
4. Tratamiento antibiótico	42
Factores adicionales que influyen en la respuesta a antimicrobianos	43
1. Formación de <i>biofilms</i>	44
i. Heterogeneidad	45
ii. Disminución de la sensibilidad a antimicrobianos	46
2. Interacciones entre especies	48
3. Papel de las células del huésped	50
Hipótesis y objetivos	53
Hipótesis	55
Objetivos	56
Trabajos de investigación	59
Caracterización del <i>biofilm</i> dual formado por <i>Mycobacterium abscessus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
Eficacia antibiótica frente a la formación de <i>biofilms</i> duales de <i>Mycobacterium abscessus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en superficies bióticas y abióticas	73
Efecto del tratamiento antipseudomónico en <i>biofilms</i> duales de <i>Mycobacterium abscessus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
Discusión	91
Conclusiones	105
Conclusions	109
Bibliografía	113

Resumen

Efecto de la terapia antimicrobiana frente a *biofilms* duales de *Mycobacterium abscessus* y *Pseudomonas aeruginosa*

La enfermedad pulmonar crónica es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística (FQ). Las bacterias se establecen en los pulmones de los pacientes con FQ formando *biofilms* polimicrobianos, estructuras agregadas de microorganismos con una alta tolerancia frente al tratamiento antimicrobiano. *Pseudomonas aeruginosa* es la especie más prevalente en estos pacientes. Sin embargo, la microbiota del ecosistema pulmonar también puede estar compuesta por otros microorganismos, entre los que se encuentran las Micobacterias No Tuberculosas (MNT), que se adquieren mayoritariamente a partir de reservorios ambientales.

Mycobacterium abscessus es un microorganismo que causa infección pulmonar en FQ cuya incidencia está aumentando globalmente. Algunos estudios sugieren que la terapia con antimicrobianos, a los que estos pacientes se exponen desde la infancia, podría favorecer la colonización pulmonar por *M. abscessus* dada su resistencia intrínseca a antibióticos. El tratamiento de la enfermedad pulmonar por *M. abscessus* se basa en la combinación de diferentes antimicrobianos, cuya elección está guiada por el antibiograma del aislado. Sin embargo, la tasa de fallo terapéutico y la recurrencia es alta, sugiriendo una falta de correlación *in vitro-in vivo*.

En este trabajo tratamos de determinar si la incorporación de factores del microambiente del huésped, como células epiteliales de pulmón, y microorganismos con los que *M. abscessus* comparte nicho, como *P. aeruginosa*, pueden modificar la sensibilidad a antimicrobianos de *M. abscessus*. Además, también pretendemos evaluar si el tratamiento antimicrobiano frente a otros patógenos frecuentemente coaislados con *M. abscessus*, como *P. aeruginosa*, podría aumentar la supervivencia de *M. abscessus* en un *biofilm* dual.

En primer lugar, caracterizamos el *biofilm* dual de *M. abscessus* y *P. aeruginosa*. Para ello, se formaron *biofilms* sobre membranas de policarbonato con una concentración fija de *P. aeruginosa* y tres inóculos diferentes de *M. abscessus* y se incubaron durante 24, 48 o 72 horas. De acuerdo con los resultados, las condiciones para producir un *biofilm* dual en el que la distribución relativa de las especies permaneciera estable fueron 72h de crecimiento, utilizando el mismo inóculo de partida para ambas bacterias (proporción 1:1). Además, comprobamos que *P. aeruginosa* inhibe el desarrollo de la población de *M. abscessus* en el *biofilm* dual. Mediante diferentes técnicas de imagen, observamos que el crecimiento de *M. abscessus* en el *biofilm* se restringía a las capas inferiores, mientras que *P. aeruginosa* crecía abundantemente en las capas superiores, lo que sugiere que la relación que se establece entre ambas bacterias es una explotación.

Con estos datos, se formaron *biofilms* de *P. aeruginosa* y/o *M. abscessus* en membranas de policarbonato durante 24 (*biofilms* tempranos) o 72 horas (*biofilms* tardíos), y se transfirieron a agar suplementado con diferentes antibióticos (ceftazidima, amikacina, colistina, claritromicina) o combinación de antibióticos (amikacina + ceftazidima). Comprobamos que amikacina, antimicrobiano de elección para el tratamiento de la enfermedad pulmonar por *M. abscessus*, mostraba una actividad menor frente a *M. abscessus* cuando forma un *biofilm* dual con *P. aeruginosa*, siendo un aumento de tolerancia el mecanismo más probablemente implicado en este fenómeno. Además, observamos que la terapia antimicrobiana dirigida específicamente a *P. aeruginosa* disminuye la interacción competitiva que se establece entre ambas especies, aumentando la supervivencia de *M. abscessus* en el *biofilm* dual.

También evaluamos la influencia de las interacciones con células epiteliales de pulmón y entre especies bacterianas en la actividad de los antimicrobianos. Para ello, se cultivaron *biofilms* monomicrobianos y duales de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* en una superficie plástica o en un modelo tridimensional de células epiteliales de pulmón durante 6 horas, y se evaluó la capacidad de diferentes antibióticos (ceftazidima, amikacina, claritromicina, colistina) de inhibir la

formación del *biofilm*. Observamos que algunos antibióticos mostraron una mayor eficacia en el modelo celular inhibiendo los *biofilms* de *P. aeruginosa* (ceftazidima en *biofilms* monomicrobianos, colistina en *biofilms* duales) que en plástico. Sin embargo, claritromicina perdió su efectividad contra *P. aeruginosa* en el modelo celular. Colistina, amikacina y claritromicina indujeron la formación de *biofilm* de *M. abscessus* en plástico, efecto que no se observó en el modelo celular, si bien ningún antibiótico inhibió la formación de *biofilms* de *M. abscessus*. *P. aeruginosa* modificó la respuesta de *M. abscessus* a antimicrobianos (ceftazidima en plástico, colistina en el modelo celular), pero no al revés. En el modelo fisiológicamente más relevante (*biofilms* duales en el modelo celular 3-D), observamos que el tratamiento con antibióticos durante el desarrollo del *biofilm* inhibió específicamente la formación de *biofilm* de *P. aeruginosa*, pero no la de *M. abscessus*, confiriendo a *M. abscessus* una ventaja adaptativa.

En conjunto, nuestros resultados muestran que los antimicrobianos dirigidos a *P. aeruginosa* en FQ aumentan la supervivencia de *M. abscessus* en *biofilms* duales. Además, la interacción que *M. abscessus* establece con *P. aeruginosa* aumenta su resistencia a antimicrobianos, fundamentalmente a amikacina. Asimismo, comprobamos que la respuesta a antimicrobianos de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* se modifica por las interacciones que establecen con las células hospedadoras, lo que subraya la importancia de evaluar la influencia del microambiente del huésped en la eficacia de los antimicrobianos.



Summary

Effect of antimicrobial therapy against *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa* dual-species biofilms

Chronic lung infection is the main cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) patients. Bacteria in the CF lung are arranged as polymicrobial biofilms, which are aggregated structures of sessile microorganisms highly tolerant to antimicrobial therapy. *Pseudomonas aeruginosa* is the most prevalent species causing acute and chronic respiratory infection among CF patients. However, the CF lung microbiota also comprises other microorganisms, such as Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM), which are presumed to be acquired from environmental reservoirs.

Mycobacterium abscessus is a microorganism that can cause biofilm-related pulmonary infections in patients with preexisting lung disease and is increasingly being isolated from respiratory samples of CF patients. Some studies suggest that antimicrobial therapy, to which CF patients are exposed since childhood, may favor the colonization of the lung environment by *M. abscessus*, given its intrinsic resistance to antibiotics. The treatment against *M. abscessus* lung disease is based on a multidrug regimen guided by the *in vitro* susceptibility testing results of the isolates. However, the rates of therapeutic failure and recurrence are high, suggesting a poor correlation between the *in vitro* result and the *in vivo* outcome.

This study aims to determine if the incorporation of factors that mimic the host microenvironment, such as lung epithelial cells, and microorganisms that share niche with *M. abscessus*, such as *P. aeruginosa*, can influence *M. abscessus* response to antimicrobial treatment. Furthermore, we aim to evaluate if the treatment directed at other classic pathogens often co-isolated with *M. abscessus*, like *P. aeruginosa*, could give an adaptive advantage to *M. abscessus*.

First, we characterized the dual species biofilms formed by *M. abscessus* and *P. aeruginosa*. For that purpose, dual species biofilms were grown on polycarbonate membranes with a fixed

Summary

concentration of *P. aeruginosa* and different inoculums of *M. abscessus*. The biofilms were then sampled at 24, 48, and 72 h and bacteria were quantified in specific media. According to the results, the conditions to produce a mature dual species biofilm in which the relative species distribution remained stable were 72 h growth of the mixed microbial culture at a 1:1 ratio. A significant decrease in mycobacterial population in dual compared to single species biofilms was found, suggesting that *P. aeruginosa* has a negative influence on *M. abscessus*. Using different microscope imaging techniques, we observed that both microorganisms were co-aggregated in a layered structure, where *P. aeruginosa* grew abundantly in the upper layers and *M. abscessus* growth was restricted to the lower layers of the biofilm, implying exploitation.

With this data, biofilms of *P. aeruginosa* and/or *M. abscessus* were grown on polycarbonate membranes for 24 (*i.e.*, early stage biofilms) or 72 hours (*i.e.*, late stage biofilms) and then transferred to agar supplemented with different clinically relevant antibiotics (ceftazidime, clarithromycin, amikacin, colistin) and one antibiotic combination (amikacin + ceftazidime). Our results revealed that amikacin, a first-line treatment in *M. abscessus* pulmonary disease, showed a decreased efficacy against *M. abscessus* when grown in dual-species biofilms with *P. aeruginosa*, and that tolerance, and not resistance, might be the mechanism involved in this phenomenon. Moreover, we observed that *P. aeruginosa* inhibits *M. abscessus* biofilm formation under control conditions, and that antimicrobial therapy selectively targeting *P. aeruginosa* diminishes this competitive interaction, hereby increasing *M. abscessus* survival.

We also evaluated the influence of interspecies and lung epithelial cells interactions on antibiotic efficacy. For that purpose, single and dual-species biofilms of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* were cultured on a plastic surface or on *in vivo*-like three-dimensional (3-D) lung epithelial cells during 6 hours, and the activity of antibiotics (colistin, amikacin, clarithromycin, ceftazidime) in inhibiting biofilm formation was evaluated. We observed that some antibiotics showed enhanced antibiotic efficacy in inhibiting *P. aeruginosa* biofilms in the presence of lung epithelial cells as compared to plastic (ceftazidime in single species biofilms, colistin in dual-species

biofilms). However, clarithromycin efficacy against *P. aeruginosa* was abolished in the 3-D lung epithelial cell model. In addition, biofilm induction of *M. abscessus* was observed by certain antibiotics on plastic (amikacin, colistin and clarithromycin), but not on 3-D cells, although no antibiotic prevented the association of *M. abscessus* with the cells. *P. aeruginosa* influenced the efficacy of certain antibiotics against *M. abscessus* (ceftazidime in plastic, colistin in 3-D cells), but not *vice versa*. Using the most physiologically relevant model (dual-species biofilms on 3-D cells), we observed that treatment with antibiotics during biofilm development reduced *P. aeruginosa* but not *M. abscessus* biofilms, resulting in a competitive advantage for the latter.

Collectively, these results suggest that antibiotic therapy in CF directed at *P. aeruginosa* can lead to an increased survival of *M. abscessus* in dual-species biofilms. Also, our study demonstrated that the susceptibility of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* is influenced by host epithelial cells and interspecies interactions, which highlights the importance of understanding the role that in vivo host and bacterial factors play in the efficacy of antibiotics.



Introducción

La fibrosis quística es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en población caucásica [3]. Los defectos en la inmunidad innata que se producen a nivel respiratorio promueven la colonización de los pulmones por una comunidad que se establece formando *biofilms* polimicrobianos [7]. Entre los microorganismos que forman esta comunidad existen patógenos “clásicos”, como *P. aeruginosa*, cuya presencia se ha asociado históricamente con una disminución de la función pulmonar [8]. Además, probablemente ligado al aumento de la esperanza de vida de estos pacientes y al uso continuado de antimicrobianos, se ha observado un incremento en los aislamientos de determinados microorganismos denominados “emergentes”. Entre estos, destaca *M. abscessus*, micobacteria no tuberculosa de crecimiento rápido intrínsecamente resistente a la mayoría de los agentes quimioterapéuticos disponibles [8, 9]. La enfermedad pulmonar por *M. abscessus* está relacionada con un descenso marcado de la función pulmonar, lo que condiciona la calidad de vida de los pacientes [10, 11]. El tratamiento de la enfermedad pulmonar por *M. abscessus* se basa en la combinación de diferentes antimicrobianos, cuya elección está guiada por el antibiograma del aislado. Sin embargo, a pesar de los prolongados tratamientos a los que se exponen los pacientes, pocos alcanzan la curación, sugiriendo una falta de correlación *in vitro-in vivo* [12].

El presente trabajo de tesis doctoral trata de determinar si la incorporación de factores del lugar de la infección, como células epiteliales de pulmón, y de microorganismos con los que *M. abscessus* comparte nicho tanto en el medio ambiente como en el microbioma pulmonar, como *P. aeruginosa*, pueden modificar la respuesta de *M. abscessus* a antimicrobianos con respecto a otros modelos ampliamente utilizados con este fin. Además, dado que los factores fisiológicos que contribuyen a la adquisición de la infección todavía no están esclarecidos, también pretendemos evaluar si el tratamiento antimicrobiano frente a otros patógenos clásicos frecuentemente coaislados con *M. abscessus*, como *P. aeruginosa*, puede eliminar selectivamente a *P. aeruginosa* y aumentar la supervivencia de *M. abscessus* en un *biofilm* dual, lo que podría contribuir a la iniciación de la infección pulmonar por *M. abscessus*.

La enfermedad pulmonar en fibrosis quística

1. Fibrosis quística: generalidades

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética causada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína transportadora CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), localizado en el brazo largo del cromosoma 7 [13-15]. Es la enfermedad autosómica recesiva que afecta más frecuentemente a la población caucásica, con una incidencia media estimada de 1 de cada 3500 nacidos vivos [16, 17], aunque estas cifras varían considerablemente en función del área geográfica estudiada y de los grupos étnicos incluidos. Gracias al abordaje multidisciplinar en el cuidado de estos pacientes, la edad media de supervivencia prevista para los nacidos en 2017 es de más de 45 años, siendo cada vez mayor el número de adultos con FQ [4].

A pesar de que se trata de una enfermedad sistémica, las manifestaciones clínicas más comunes son la enfermedad pulmonar, resultante de un ciclo de infección/inflamación persistente, y la disfunción pancreática. Además, los individuos con FQ presentan un alto grado de variabilidad fenotípica, por lo que la gravedad de la enfermedad, la presencia de complicaciones y la tasa de supervivencia varían incluso entre pacientes que presentan el mismo genotipo de *CFTR* [18, 19].

2. Proteína CFTR: funcionamiento y mutaciones

La proteína CFTR pertenece a la familia de proteínas ABC (*ATP-Binding Cassette*), y se expresa principalmente en la membrana apical de las células ciliadas del epitelio aéreo y en conductos glandulares [20]. La estructura de la proteína se muestra en la Figura 1.

Aunque funciona principalmente como un canal de transporte de cloro sujeto a regulación metabólica [21], también está implicada en la secreción de iones bicarbonato y en la inhibición del canal de sodio epitelial (ENaC) [22, 23]. Como consecuencia, las mutaciones de CFTR conllevan un defecto en el transporte de iones, que se caracteriza por una secreción deficiente de aniones cloro y bicarbonato y un aumento en la absorción de sodio.

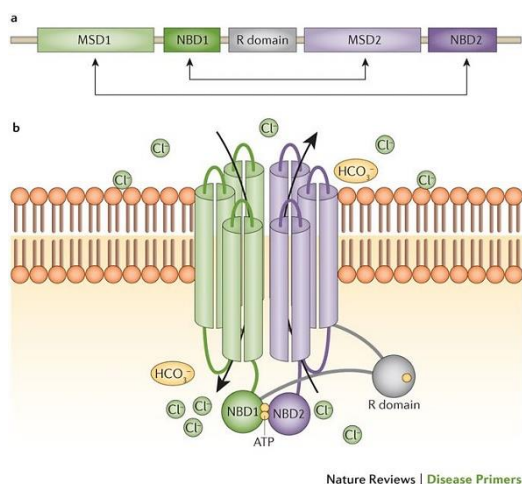


Figura 1. Estructura proteína CFTR. a)

Estructura lineal de la proteína CFTR. b) La proteína está compuesta por dos grupos de 6 regiones transmembrana (MSD 1 y 2: *Membrane Spanning Domain*), cada uno de ellos conectado a dos sitios de unión de nucleótidos en el lado intracelular (NBD 1 y 2: *Nucleotide-Binding Domains*) que se unen a ATP. La apertura del canal tiene lugar cuando el dominio R se fosforila por la acción de proteína quinasa A [1, 2] dependiente de AMP_c. Figura tomada de [3], con permiso

Aparte de su función principal como proteína transportadora, existen otros mecanismos celulares en los que está implicada, como interacción con las vías celulares relacionadas con la inflamación [24]. Como consecuencia, la mutación de CFTR puede tener un alto impacto en el ambiente celular, por lo que la tendencia actual consiste en ver a la proteína CFTR no sólo como una mera proteína transportadora, sino como un complejo sistema de señalización celular.

Se han registrado más de 2000 variantes del gen *CFTR* en la *Cystic Fibrosis Mutation Database*. De estas, 336 causan FQ (ver www.cftr2.org), siendo F508del la mutación más frecuente [25]. Las

mutaciones en el gen *CFTR* que causan patología tienen como consecuencia la disminución del número de canales que se expresan en las células y/o la alteración de la funcionalidad del canal, y se han dividido tradicionalmente en 6 clases para explicar el mecanismo por el que causan la enfermedad (Tabla 1).

Tabla 1. Clases de mutaciones del gen *CFTR* [3]

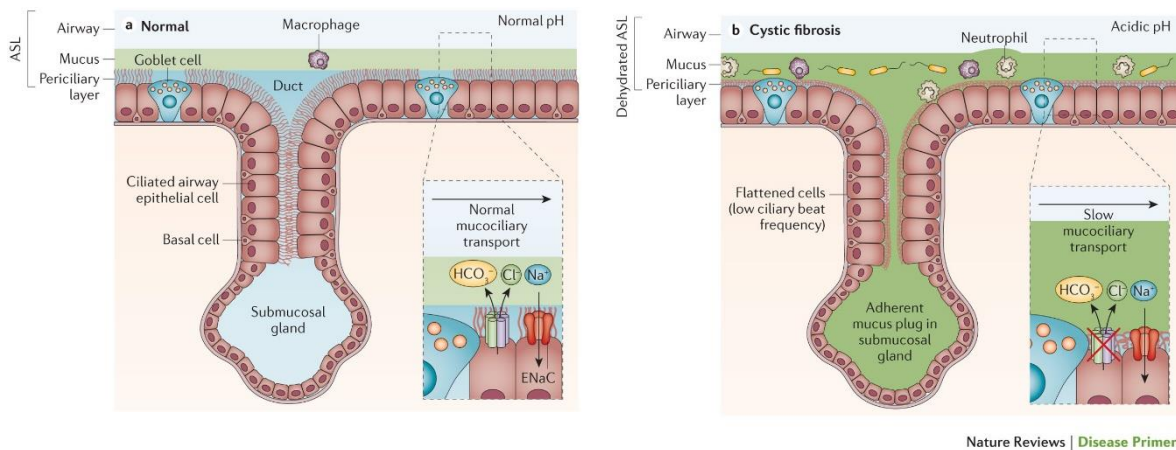
	CLASE I	CLASE II	CLASE III	CLASE IV	CLASE V	CLASE VI
Defecto molecular	Producción defectuosa	Bloqueo procesamiento / tráfico intracelular	Defecto regulación	Conductancia disminuida	Disminución estabilidad de ARNm	Renovación acelerada
Consecuencia	Disminución número canales	Disminución número canales	Alteración funcionalidad canal	Alteración funcionalidad canal	Disminución número canales	Disminución número canales
Ejemplo de mutaciones específicas	G542X, W1282X, R553X	F508del, N1303K, I507del	G551D, S549N	D1152H, R347P, R117H	621 + 1G>T, 3849 + 10kbC>T y R117H+5T	S1455X, L1399X

La expresión de la enfermedad varía con el tipo de mutación, siendo las mutaciones de las clases I, II y III las que se asocian con un fenotipo más agresivo. Algunas manifestaciones de la FQ, como la insuficiencia pancreática, pueden predecirse a partir del genotipo [26]. Sin embargo, existen factores ambientales y genéticos que influyen en la manifestación de la enfermedad pulmonar, por lo que, en este caso, el genotipo de *CFTR* no es útil para determinar el fenotipo. Con respecto a los factores genéticos, se han descrito polimorfismos en genes relacionados con la inmunidad natural y adaptativa, como la lectina fijadora de manosa o el TGF-beta 1 (*Transforming Growth Factor*), que se asocian con la gravedad de la enfermedad pulmonar [27-29]. Por ello, el estudio de estos modificadores genéticos es esencial para identificar los genotipos relacionados con peor pronóstico y así mejorar el cuidado de individuos con FQ.

3. Patogénesis de la enfermedad pulmonar

El fallo respiratorio secundario a la enfermedad pulmonar progresiva es la primera causa de muerte entre los individuos con FQ [4]. La patología pulmonar obstructiva típica de la FQ se produce fundamentalmente como consecuencia de la alteración de dos mecanismos de la defensa inmune innata: el transporte mucociliar y la actividad de los péptidos antimicrobianos. El defecto en el transporte iónico en FQ tiene como consecuencia la modificación de las propiedades electrofisiológicas del epitelio aéreo, que están reguladas por los canales *CFTR* (secreción Cl^- y HCO_3^-) y *ENaC* (absorción Na^+). En condiciones normales, el transporte epitelial de iones, principalmente el mediado por *CFTR*, favorece el movimiento osmótico del agua a través del epitelio mediante la generación de gradientes electroquímicos [30]. Así, la disminución de secreción aniónica provoca una reducción en el transporte de agua al líquido superficial de la vía aérea, que se deshidrata. Esto conlleva la disfunción del sistema mucociliar (Figura 2) [31, 32].

Además, nuevas teorías proponen que las propiedades reológicas del moco también dependen de la secreción de HCO_3^- [33], por lo que el déficit de la secreción de este anión en las glándulas



Nature Reviews | Disease Primers

Figura 2. Esquema fisiopatología pulmonar. a) En condiciones normales, la secreción de Cl^- y HCO_3^- , mediada por CFTR, y la absorción de Na^+ , mediada por ENaC, se coordinan para mantener una altura y viscosidad de líquido superficial. Esto permite que los cilios se muevan embebidos en el líquido periciliar y transporten el moco a través de la superficie del epitelio. b) En FQ, una disminución en la secreción epitelial de Cl^- y HCO_3^- y un aumento en la absorción de Na^+ provocan la deshidratación del líquido periciliar, que tiene como consecuencia el colapso de los cilios y el engrosamiento del moco, que deja de aclararse. Figura tomada de [3], con permiso.

submucosas podría promover un incremento en la viscosidad y en la adherencia del moco, que se fija en el orificio glandular y no se desprende con normalidad. Esto contribuye a la formación placas de moco con zonas hipóxicas en la superficie epitelial [34]. Asimismo, el pH ácido del medio causado por el déficit de secreción de iones bicarbonato inactiva a los péptidos antimicrobianos, que pierden su actividad bactericida [35].

Este ambiente favorece que diferentes microorganismos se establezcan en las vías respiratorias formando agregados denominados *biofilms*. Dicha infección provoca una respuesta celular exacerbada mediada principalmente por neutrófilos, que, incapaces de controlar la infección, liberan elastasas que contribuyen al daño de las vías respiratorias mediante (i) la digestión de la matriz extracelular, (ii) el daño a las proteínas de las vías aéreas y (iii) el incremento en la producción y viscosidad del moco [36, 37]. Con el tiempo, el círculo vicioso provocado por la disminución del aclaramiento de las secreciones, la invasión bacteriana y la respuesta celular provoca daños irreversibles a las vías aéreas, que avanzan a bronquiectasias y culminan en fallo respiratorio.

4. Microbiota del ecosistema pulmonar

La infección respiratoria crónica contribuye notablemente a la morbimortalidad en FQ [38]. Por ello, es necesario conocer los microorganismos que colonizan las vías aéreas, así como la dinámica poblacional que regula la composición de la comunidad en los diferentes estados clínicos (estabilidad y exacerbación), para optimizar el tratamiento de estos pacientes.

i. Visión tradicional

El diagnóstico microbiológico en FQ se ha basado en el empleo de medios de cultivo selectivos para cultivar las muestras respiratorias con el fin de inhibir el crecimiento de la microbiota orofaríngea y favorecer el de determinadas bacterias vinculadas a infección pulmonar [39]. Históricamente, el papel de patógeno respiratorio en FQ ha estado asociado a los denominados patógenos “clásicos”: microorganismos que colonizan las vías aéreas gradualmente en función de la edad del paciente. En este grupo se encuentran *Haemophilus influenzae*, colonizador precoz de las vías aéreas, seguido de *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, y el complejo *Burkholderia cepacia* [8].

Pseudomonas aeruginosa: el patógeno por excelencia

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo aerobio, no fermentador, oxidasa positivo y móvil que puede colonizar con facilidad el tracto respiratorio de los pacientes con FQ y persistir gracias a su capacidad de adaptación al medio, mínimo requerimiento de nutrientes y resistencia al tratamiento antimicrobiano y al sistema inmunitario.

Inicialmente, la infección-colonización pulmonar por *P. aeruginosa* suele ser intermitente y se produce por cepas adquiridas a partir de fuentes ambientales, si bien existe evidencia de la capacidad de transmisión entre individuos [40-42]. Con el tiempo, se produce la selección de una cepa, generalmente de fenotipo mucoso, que se establece causando la infección crónica [43].

Aproximadamente un 80% de los pacientes adultos están infectados crónicamente por *P. aeruginosa*. Además, hasta en un 40% de los mismos, *P. aeruginosa* es el patógeno dominante de la microbiota pulmonar [44]. La adaptación de *P. aeruginosa* al microambiente pulmonar en FQ es multifactorial y está estrechamente relacionada con la pérdida de la funcionalidad de CFTR. La deshidratación de la capa de moco, la disminución del aclaramiento ciliar, y el ambiente químico (bajo nivel de oxígeno, altos niveles de hierro, disminución del pH, altos niveles de radicales libres de oxígeno...) son los responsables de generar muchos de los fenotipos relacionados con FQ de *P. aeruginosa* (p. ej., la pérdida de movilidad, la formación de *biofilms*, el metabolismo anaerobio, y la resistencia a compuestos antimicrobianos) [45, 46]. Una vez *P. aeruginosa* se establece crónicamente, es frecuente que surjan variables hipermutadoras debido al estrés ambiental y al crecimiento en forma de *biofilms*, lo que contribuye, aún más, a la resistencia a antimicrobianos [47, 48].

Tanto los componentes de *P. aeruginosa* como los factores de virulencia que secreta son los responsables de la generación de una respuesta inflamatoria exacerbada, que es destructiva para el huésped, pero no para el patógeno. Al final, la inflamación causada por este microorganismo tiene un grave impacto en la función pulmonar de los pacientes con FQ y es uno de los factores que contribuye a la mortalidad en FQ [49-51].

El tratamiento agresivo de la primoinfección consigue una alta tasa de erradicación (63-100%), retrasando el establecimiento de la infección crónica [52]. Por ello, el cultivo bimensual desde la infancia de muestras respiratorias para la detección de *P. aeruginosa* es uno de los pilares fundamentales del cuidado de estos pacientes, ya que en etapas iniciales de la colonización los pacientes suelen ser asintomáticos. Cuando se detecta un cultivo positivo, se lleva a cabo una estrategia terapéutica basada en el uso de antimicrobianos inhalados, principalmente colistina (un mes) o tobramicina (28 días), combinados o no con ciprofloxacino oral durante 2-3 semanas [52]. Esta estrategia ha demostrado su eficacia en la reducción de la prevalencia de este microorganismo [53, 54]. Si la primoinfección se manifiesta como una exacerbación, entonces

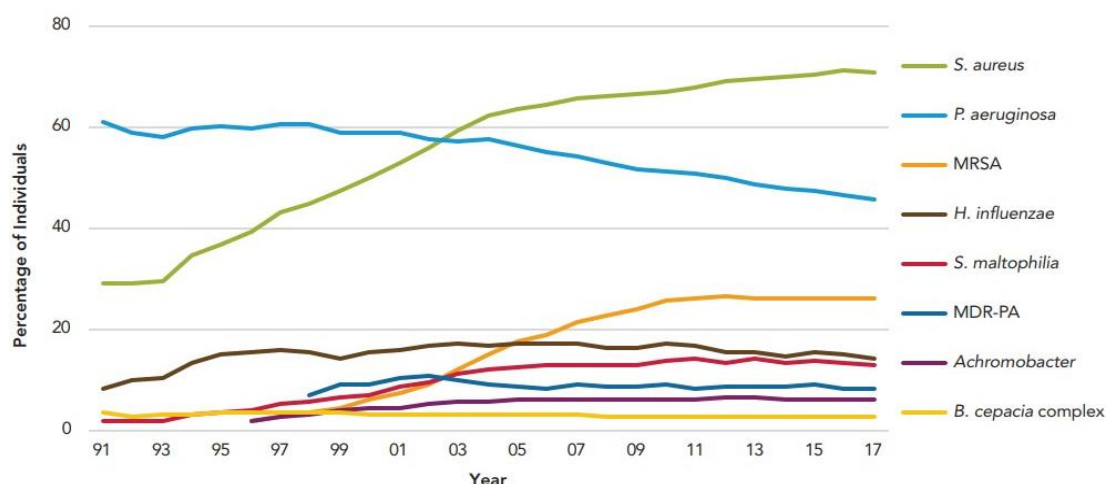


Figura 3. Prevalencia de microorganismos respiratorios en FQ en EEUU, 1991-2017. Tomado del informe anual del registro de pacientes de la Cystic Fibrosis Foundation del 2017 [4]. MRSA: Methicillin-Resistant *S. aureus*; MDR-PA: Multidrug-resistant *P. aeruginosa*

el tratamiento será el establecido frente a las mismas: en el caso de exacerbaciones leves-moderadas, se empleará ciprofloxacino oral. Sin embargo, en las exacerbaciones graves el tratamiento se basa en la utilización un beta-lactámico con actividad antipseudomónica (p. ej., ceftazidima, cefepima) junto a un aminoglucósido (p. ej., tobramicina, amikacina) o una fluoroquinolona [52].

Una vez establecida la infección crónica, el tratamiento antimicrobiano se basará en el uso de antibióticos inhalados de forma continuada (colistina) o intermitentemente (tobramicina o aztreonam lisina, en ciclos de 28 días) tanto como persista la colonización [52].

Patógenos emergentes en fibrosis quística

El aumento en la supervivencia de los pacientes con FQ, el uso generalizado de antimicrobianos para el tratamiento de la infección pulmonar, la introducción de medidas de control de la infección y el avance en las técnicas diagnósticas han supuesto un cambio en la epidemiología de los microorganismos [8, 55]. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp, *S. aureus* metilín-resistente (SAMR) y las micobacterias no tuberculosas (MNT) son considerados patógenos emergentes en FQ [56]. La evolución de la prevalencia de los microorganismos clásicos y de algunos de los emergentes en los últimos años se puede encontrar en la Figura 3.

De los microorganismos anteriormente citados, *P. aeruginosa*, el complejo *B. cepacia*, la especie *M. abscessus* (con sus 3 subespecies) y *S. aureus* meticilín-resistente son los que se asocian más frecuentemente a una disminución de la función pulmonar. Por el contrario, la contribución de *Achromobacter* spp y *S. maltophilia* a la patología pulmonar no está del todo definida [56, 57].

ii. Nuevas perspectivas

Gracias a los avances en las técnicas de secuenciación masiva, hoy en día sabemos que las vías aéreas de los pacientes con FQ están colonizadas por una comunidad compleja de microorganismos, entre los que se encuentran virus (p. ej., bacteriófagos, virus influenza, virus respiratorio sincitial), hongos (p. ej., *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y *Malassezia* spp.) y bacterias [57-59]. En consecuencia, aparte de los microorganismos citados en el apartado anterior, existen muchas otras especies que pueden contribuir potencialmente a la patogénesis de la enfermedad pulmonar.

Un número creciente de estudios ha caracterizado la composición bacteriana de la microbiota pulmonar mediante la secuenciación de la subunidad 16S del ARN ribosomal, utilizando mayoritariamente muestras de esputo y lavado broncoalveolar. Así, hoy sabemos que la fracción mayoritaria está compuesta por especies que forman parte de la microbiota orofaríngea, como *Streptococcus* spp., *Prevotella*, *Veillonella*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Gemella*, *Granulicatella* y *Fusobacterium*, cuya abundancia relativa y prevalencia varían entre pacientes [60-62]. Asimismo, la heterogeneidad de las vías aéreas, en las que existe un gradiente de oxígeno decreciente con zonas anaeróbicas [34], también contribuye a la una selección diferencial de la población, que se traduce en una variabilidad espacial de la comunidad dentro de los pulmones del mismo paciente [63].

Durante su vida, los pacientes con fibrosis quística sufren empeoramientos periódicos de la sintomatología respiratoria, denominados exacerbaciones. Este empeoramiento del estado

basal se trata desde una perspectiva multidisciplinar, que incluye el uso de antibioterapia dirigida al patógeno habitual que se aísla en muestras respiratorias [64-66].

El uso acumulado de diferentes ciclos antibióticos parece ser uno de los factores que contribuye a la modificación de la composición de la comunidad bacteriana con la edad del paciente, siendo ésta más compleja durante la infancia de los pacientes y hasta la adolescencia, y decayendo su diversidad cuando alcanzan la edad adulta [67, 68]. Así, durante las etapas finales de la enfermedad pulmonar, el nicho puede estar colonizado por un único microorganismo, generalmente *P. aeruginosa* [69, 70].

Aunque queda mucho por comprender, es posible que la modificación de la estructura de la comunidad sea la causa del empeoramiento de la función pulmonar. Por ello, la visión ecológica de la infección pulmonar en FQ posee una gran relevancia terapéutica, ya que ofrece la posibilidad de explorar la manipulación de las condiciones del medio para favorecer el establecimiento de la comunidad menos patógena [71].

Infección pulmonar por *Mycobacterium abscessus* en fibrosis quística

1. La especie *Mycobacterium abscessus*

Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos e inmóviles que poseen determinados elementos diferenciadores, entre los que destaca la existencia de una pared celular gruesa de carácter lipófilo que les confiere una marcada impermeabilidad, así como la característica de ser ácido-alcohol resistentes. Existen tres bloques mayoritarios en los que se dividen las especies de micobacterias que causan patología en humanos: (i) El complejo *Mycobacterium tuberculosis*, (ii) *Mycobacterium leprae*, y (iii) las micobacterias no tuberculosas (MNT). Históricamente, las micobacterias se han diferenciado por sus características fenotípicas, específicamente por su tasa de crecimiento y por la producción o no de pigmento cuando son

Tabla 2. Clasificación de las principales especies de micobacterias que causan enfermedad en humanos

Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento
<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. tuberculosis</i> • <i>M. bovis</i> • <i>M. africanum</i> • <i>M. microti</i> • <i>M. canetti</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. kansasii</i> • <i>M. marinum</i> • <i>M. goodii</i> • <i>M. goodii</i> • <i>M. scrofulaceum</i> • Complejo <i>M. avium</i> <ul style="list-style-type: none"> - <i>M. avium</i> - <i>M. intracellulare</i> - <i>M. chimaera</i> • Complejo <i>M. terrae</i> • <i>M. ulcerans</i> • <i>M. xenopi</i> • <i>M. simiae</i> • <i>M. malmoense</i> • <i>M. szulgai</i> • <i>M. asiaticum</i> • <i>M. haemophilum</i>
<i>Mycobacterium leprae</i>	
Micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido	
Complejo <i>M. fortuitum</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>M. fortuitum</i> • <i>M. peregrinum</i> • <i>M. porcinum</i> <p><i>M. chelonae</i></p> <p><i>M. abscessus</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>M. abscessus</i> subespecie <i>abscessus</i> • <i>M. abscessus</i> subespecie <i>bolletii</i> • <i>M. abscessus</i> subespecie <i>massiliense</i> <p><i>M. smegmatis</i></p> <p><i>M. mucogenicum</i></p>	

expuestas a la luz, siguiendo la clasificación propuesta por Runyon en 1959 [72]. La Tabla 2 ofrece una clasificación más actual de las micobacterias que causan enfermedad en humanos.

Las MNT de crecimiento rápido (grupo 4 de Runyon) son aquellas que crecen en medios de cultivo sólidos en un tiempo igual o menor a 7 días. De estas, las más relevantes clínicamente son *M. abscessus*, el complejo *M. fortuitum* y *M. chelonae*. Estos microorganismos son ubicuos en el medio ambiente, encontrándose principalmente en ambientes acuáticos, incluidos los sistemas de distribución de agua potable, y en el suelo [73]. Cabe resaltar su capacidad de supervivencia en medios considerados *a priori* hostiles, pudiendo crecer en ausencia de nutrientes, a altas temperaturas, e incluso en soluciones desinfectantes, lo que las convierte en agentes etiológicos frecuentemente asociados con brotes de infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria [74-76].

La especie *M. abscessus* está dividida en 3 subespecies: *M. abscessus* subesp. *abscessus*, *M. abscessus* subesp. *bolletii* y *M. abscessus* subesp. *massiliense* [77]. *M. abscessus* causa

principalmente infección pulmonar en pacientes con enfermedad pulmonar subyacente, como fibrosis quística, e infecciones de piel y partes blandas, si bien puede causar infección en casi cualquier órgano humano [78].

i. Factores de patogenicidad relevantes en fibrosis quística

Factores que favorecen la adaptación al nicho pulmonar

M. abscessus es un patógeno intracelular facultativo que presenta dos fenotipos diferentes: el de colonia lisa (L) y el rugoso (R), resultante de un déficit de glucopeptidolípidos (GPL) en la superficie bacteriana. Ambos fenotipos cumplen funciones diversas: el fenotipo L facilita la invasión del huésped gracias a la expresión de GPL, inmunológicamente inactivo, y coloniza el nicho y persiste gracias a la formación de *biofilms* [80]. Una pérdida espontánea de GPL en la superficie da lugar al fenotipo R, que se asocia con la aparición de una fuerte respuesta inflamatoria y con apoptosis celular, exacerbando la sintomatología del paciente [81].

Tabla 3. Factores de patogenicidad de *Mycobacterium abscessus* implicados en la supervivencia intracelular [79]

Tipo	Nombre	Función
Factores micobacterianos	Familia de proteínas PE- PPE y ESAT-6	Sistema de secreción dependiente de ATP
	Proteínas MCE e yrbE	Invasión de las células diana
	Proteínas similares a LpqH	Modificación de la respuesta del huésped
	Factores reguladores de patogenicidad	Control de la expresión de factores de patogenicidad. Homólogos de los factores sigma de <i>M. tuberculosis</i>
Factores no-micobacterianos	Fosfolipasa C (similar a la de <i>Streptomyces</i> spp., <i>Chromobacterium violaceum</i> y <i>P. aeruginosa</i>)	Escape de las vacuolas fagocíticas
	MgtC (similar a la de las actinobacterias)	Incremento de la concentración de Mg ²⁺ intracelular, facilita su supervivencia
	MsrA (similar a la de <i>Rhodococcus</i> spp.)	Protección de las especies reactivas de nitrógeno generadas por los macrófagos
	Sideróforo (similar a <i>Rhodococcus</i> spp, <i>Salmonella</i> spp o <i>Burkholderia</i> spp)	Quelante de hierro

Numerosos factores de patogenicidad, tanto comunes a otras micobacterias como adquiridos de otros microorganismos, son los responsables de facilitar la supervivencia de *M. abscessus* en el interior de las células (Tabla 3). Asimismo, *M. abscessus* también posee genes implicados en el metabolismo de compuestos aromáticos [82], que contribuyen a su desarrollo extracelular y a su implantación en el árbol bronquial [79]. Estos factores de patogenicidad son especialmente importantes para la infección en FQ, y podrían haber sido adquiridos mediante transferencia horizontal de *P. aeruginosa* o *B. cepacia*, microorganismos con los que comparte nicho ecológico.

Mecanismos de resistencia a antimicrobianos

M. abscessus es intrínsecamente resistente a la mayoría de los agentes quimioterapéuticos, incluidos los antituberculosos [83, 84]. Diversos mecanismos son responsables de la resistencia natural que *M. abscessus* posee frente a la acción de los antimicrobianos, entre los que se encuentran su crecimiento lento, la hidrofobicidad de su pared, la expresión de bombas de eflujo, la modificación de las dianas terapéuticas y la síntesis de enzimas modificadoras o degradadoras de antibióticos. Muchos de estos mecanismos están regulados por un factor de transcripción, WhiB7, que se expresa cuando *M. abscessus* es expuesto a condiciones desfavorables, incluyendo el tratamiento con antimicrobianos, confiriendo a la micobacteria una resistencia adaptativa [85].

El mecanismo de resistencia inducible mejor conocido en micobacterias es el grupo de genes *erm* (*erythromycin resistance methylase*), que se activan en presencia de macrólidos y confieren resistencia a los mismos por metilación de ARN ribosomal 23S, lo que impide que se unan a su diana. En este sentido, es importante identificar la subespecie de *M. abscessus* implicada en el proceso infeccioso para optimizar el tratamiento antimicrobiano, ya que la mayor parte de los aislados de *M. abscessus* subesp. *abscessus* y todos los de *M. abscessus* subesp. *bolletii* poseen un gen inducible de resistencia a macrólidos activo, el gen *erm*(41), mientras que el de *M.*

abscessus subesp. *massiliense* se encuentra truncado, siendo por tanto no funcional [86-88]. Así, *M. abscessus* subesp. *masiliense* parece responder mejor a la terapia basada en macrólidos [89].

Al contrario que otras especies bacterianas, las resistencias adquiridas a antimicrobianos en *M. abscessus* son principalmente el resultado de mutaciones espontáneas, aunque no se puede descartar la posibilidad de transferencia de mecanismos de resistencia mediante elementos móviles entre especies de micobacterias [90].

La tabla 4 ofrece un resumen de los principales mecanismos de resistencia natural y adquirida de *M. abscessus*.

Tabla 4. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en *Mycobacterium abscessus* [9, 85]

Descripción mecanismo de resistencia		Antibiótico/Familia de antibióticos afectados
Baja permeabilidad de la pared celular		β -lactámicos, aminoglucósidos
Enzimas modificadoras / degradadoras de antibióticos	2-N-acetiltransferasas y fosfotransferasas	Aminoglucósidos
	β -lactamasas	β -lactámicos
	ADP-ribosiltransferasa	Rifampicina
	Mono-oxigenasas	Rifampicina, tetraciclinas
	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxilviniltransferasa	Fosfomicina
Modificación de la diana – gen <i>erm</i> (41)		Claritromicina, eritromicina
Bombas de eflujo	Transportador familia ABC	Papel no identificado en <i>M. abscessus</i>
	Transportador MmpL	Papel no identificado en <i>M. abscessus</i>
Regulación de la transcripción – familia <i>whiB7</i>		Aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas
Polimorfismo genético de los genes diana – regiones determinantes de resistencia a quinolonas (GyrA y GyrB)		Fluoroquinolonas
Mutaciones espontáneas de la diana farmacológica	Mutación <i>rrs</i>	Aminoglucósidos
	Mutación <i>rrl</i>	Macrólidos

2. Epidemiología

M. abscessus se está aislando cada vez más frecuentemente en muestras respiratorias de pacientes con FQ [91, 92]. Su distribución es mundial y su prevalencia oscila entre un 7 y un 13% según diversos estudios [10, 93-97], aunque no se conoce con exactitud debido a que la notificación de la infección a los organismos de salud pública no es obligatoria. Además, a pesar de que la prevalencia de la infección por MNT es mayor en población adulta, se ha observado que *M. abscessus* afecta a todos los grupos de edad, existiendo en algunos estudios picos de prevalencia a los 11-15 años [98-100].

La ruta de infección principal es mediante la exposición de los pacientes a reservorios ambientales, especialmente por inhalación de aerosoles procedentes de los sistemas de agua domésticos [101-103]. De hecho, las bacterias que se encuentran más habitualmente coinfectando a estos pacientes son *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* [98, 104, 105], microorganismos con los que *M. abscessus* comparte nicho ecológico, sugiriendo la infección a partir del mismo reservorio ambiental [79]. Asimismo, también se ha descrito la diseminación de un clon a nivel global cuya transmisión podría darse entre humanos, probablemente a través de fómites o aerosoles [92, 106].

Los factores que contribuyen al aumento de casos de infección por *M. abscessus* siguen sin esclarecerse. Entre las hipótesis disponibles, cabe destacar la exposición de los pacientes con FQ a antibióticos por diferentes vías de administración [93, 107], lo que favorecería la eliminación de microorganismos competidores y la consecuente toma del nicho por *M. abscessus* gracias a su resistencia intrínseca a antimicrobianos. Asimismo, también se ha visto relacionado con el incremento de los casos el uso de medicación que modifica la inmunidad del huésped, como corticoides o macrólidos, y el aumento de la exposición ambiental [108-110].

3. Manifestaciones clínicas y diagnóstico

Al igual que todas las MNT, *M. abscessus* es capaz de colonizar transitoria-, intermitente- o permanentemente el tracto respiratorio de pacientes con FQ sin causar enfermedad pulmonar, por lo que su aislamiento en muestras respiratorias no siempre tiene significado clínico.

La infección pulmonar causada por *M. abscessus* en FQ es una enfermedad inflamatoria progresiva definida por un conjunto de criterios clínicos, microbiológicos y radiológicos establecidos por la ATS (*American Thoracic Society*) y la IDSA (*Infectious Diseases Society of America*), descritos en la tabla 5.

Tabla 5. Criterios ATS/IDSA para el diagnóstico de enfermedad pulmonar por MNT [111]

Criterios clínicos (ambos requeridos)

- Síntomas pulmonares con nódulos o cavidades en la radiografía de tórax, o hallazgo de bronquiectasias multifocales con múltiples nódulos de pequeño tamaño mediante tomografía computarizada de tórax de alta resolución.
- Exclusión apropiada de otros diagnósticos.

Criterios microbiológicos (uno de los siguientes requerido)

- Cultivo positivo de, al menos, dos muestras de esputo obtenidas por expectoración.
- Cultivo positivo de, al menos, una muestra de lavado bronquial.
- Biopsia transbronquial u otro tipo de biopsia tejido pulmonar con características histopatológicas típicas de micobacterias (inflamación granulomatosa y tinción ácido-alcohol resistente positiva) y una o más muestras de esputo o de lavado bronquial positivas para MNT.

Cabe destacar que los síntomas de esta infección pueden ser sutiles y poco específicos, por lo que el diagnóstico puede retrasarse durante años en la ausencia de una búsqueda activa. Por ello, la CFF (*Cystic Fibrosis Foundation*) y la ECFS (*European Cystic Fibrosis Society*) recomiendan un cribado anual para MNT en ausencia de síntomas compatibles con enfermedad pulmonar por MNT en pacientes capaces de expectorar espontáneamente [12].

4. Tratamiento antibiótico

Debido a la falta de ensayos clínicos en este campo, el tratamiento antimicrobiano de la enfermedad pulmonar por *M. abscessus* no está bien definido. La CFF en asociación con la ECFS recomiendan, en primer lugar, tratar otras bacterias que pudieran contribuir potencialmente al

cuadro clínico. Si tras esa acción no se observa mejoría de los síntomas, entonces se recomienda el tratamiento específico de la infección por *M. abscessus*, en el que se sigue un esquema de tratamiento dividido en dos fases: la intensiva y la de continuación [12]. El objetivo de la fase intensiva es reducir rápidamente la carga bacteriana. Para ello, se recomienda el uso de un macrólido vía oral (azitromicina o claritromicina) en asociación con dos antibióticos vía intravenosa (habitualmente amikacina + cefoxitina/imipenem/tigeciclina) durante 3-12 semanas. La fase de continuación debe incluir un macrólido vía oral y amikacina inhalada, junto con otros 2-3 antimicrobianos vía oral (minociclina, clofazimina, moxifloxacino o linezolid) y tiene una duración de, al menos, 12 meses.

La elección de los antibióticos debe estar guiada por el perfil de sensibilidad a antimicrobianos del aislado. Actualmente, las únicas guías terapéuticas disponibles para la realización de pruebas de sensibilidad *in vitro* a antimicrobianos de *M. abscessus* son las del CLSI [112]. Sin embargo, muchas veces el perfil de sensibilidad *in vitro* no se correlaciona con los resultados obtenidos *in vivo*, por lo que, a pesar de la duración del tratamiento y de la combinación de varios agentes antimicrobianos con diferentes mecanismos de acción, únicamente un 25-58% de los pacientes logran la cura definitiva [113, 114]. Además, el uso prolongado de antimicrobianos no sólo causa la aparición de efectos adversos, sino que también origina un elevado gasto sanitario, siendo comparable al generado por el VIH en EEUU [115, 116].

Factores adicionales que influyen en la respuesta a antimicrobianos

Determinar la sensibilidad de un aislado clínico a antimicrobianos es una de las principales funciones de los laboratorios de microbiología clínica. Sin embargo, el modelo que se usa no deja de ser una simplificación de la realidad, y, aunque se tengan en cuenta determinadas características de la infección (p.ej., la localización) a la hora de escoger un antimicrobiano, la respuesta clínica puede no corresponderse con los resultados esperados [117-122]. Se sabe que la actividad de los antimicrobianos depende del estado metabólico del microorganismo, así

como del microambiente existente en el lugar de la infección [123-128]. Por lo que, entre los factores que influyen en la falta de correlación de los resultados *in vivo-in vitro*, se encuentran: la formación de *biofilms*, la presencia de otras especies bacterianas y la interacción con las células hospedadoras.

1. Formación de *biofilms*

Las bacterias presentan dos tipos diferentes de crecimiento: el crecimiento en estado planctónico, en el que las células flotan o nadan expuestas al entorno, y el crecimiento sésil en forma de *biofilms*.

Los *biofilms* son comunidades constituidas a partir de células que pasan de un estado planctónico a uno sésil en respuesta a estímulos ambientales. En ellas, las células se adhieren entre sí y/o a una superficie, generalmente mediante elementos de la superficie bacteriana, como pili y flagelos [129]. Al aumentar de tamaño, los agregados se recubren de una matriz autoproducida cuya composición varía con la especie bacteriana [130], e incluso puede contener sustancias derivadas del ambiente en el que se encuentren (p. ej., del huésped) [131, 132].

La estructura del *biofilm* maduro está formada por microcolonias rodeadas de canales de contenido hídrico que facilitan el intercambio de sustancias entre el *biofilm* y el ambiente [133]. Estas bacterias se comunican entre sí mediante moléculas señalizadoras que modifican la expresión genética de la población, fenómeno denominado *quorum sensing* [134]. A medida que la población aumenta, se produce la dispersión de bacterias individuales o microcolonias, lo que permite la colonización de nuevos nichos [135, 136].

Desde una perspectiva evolutiva, el crecimiento sésil en forma de *biofilm* supone una ventaja frente al crecimiento en estado planctónico debido a la protección frente a depredadores y al estrés xenobiótico, por lo que los *biofilms* son ubicuos tanto en la naturaleza como en el cuerpo humano [137]. De hecho, se estima que más del 99 % de la biomasa total de microorganismos que habitan la tierra se encuentran agrupados en *biofilms* [137, 138].

En el ámbito sanitario, el 65-80% de las infecciones están asociadas a esta forma de crecimiento [136]. En términos generales, las infecciones relacionadas con el desarrollo de *biofilms* pueden estar relacionadas con el uso de materiales extraños, como dispositivos o implantes, o bien establecerse en regiones donde la respuesta inmunitaria del huésped está comprometida, como en los pulmones de pacientes con FQ o en úlceras crónicas [139].

Debido a las interacciones físicas y sociales que existen entre las células, las bacterias que constituyen los *biofilms* presentan características fenotípicas y fisiológicas diferentes a las que crecen en estado planctónico.

i. Heterogeneidad

En primer lugar, las condiciones ambientales no son homogéneas en los *biofilms*. Debido a su organización espacial, los sustratos metabólicos (oxígeno, nutrientes) son consumidos por las células que se encuentran en las capas superiores del *biofilm*, mientras que los productos metabólicos tienden a acumularse en el interior del *biofilm*. Esto conlleva la generación de gradientes químicos desde la superficie hacia las capas más profundas de la estructura [140].

En respuesta a estas condiciones ambientales, la fisiología y el metabolismo microbiano se diferencian dentro de la macroestructura [141]. Así, en el interior del *biofilm*, caracterizado por la privación de nutrientes, hipoxia, y un ambiente ácido, las bacterias entran en un bajo estado metabólico y su crecimiento se enlentece o detiene, contribuyendo a la generación de los estados fisiológicos reversibles denominados “viable pero no cultivable” (*viable but not culturable*, VBNC) y “persistente” (*persisters*), relacionados con la tolerancia a antimicrobianos y la perpetuación de la infección [142-144]. Mientras, en las capas exteriores del *biofilm* su actividad metabólica se mantiene activa.

En la naturaleza, los microorganismos viven en comunidades en forma de *biofilms* multiespecie [145, 146]. En consecuencia, esta heterogeneidad espacial se modela, además, como resultado de las interacciones que se establecen entre las diferentes especies bacterianas que forman los

biofilms y que ayudan a mantener las funciones de la comunidad. De hecho, es posible determinar el tipo de interacción que existe entre las especies en función de la distribución espacial que adopta cada una en el *biofilm* (Figura 4) [5].

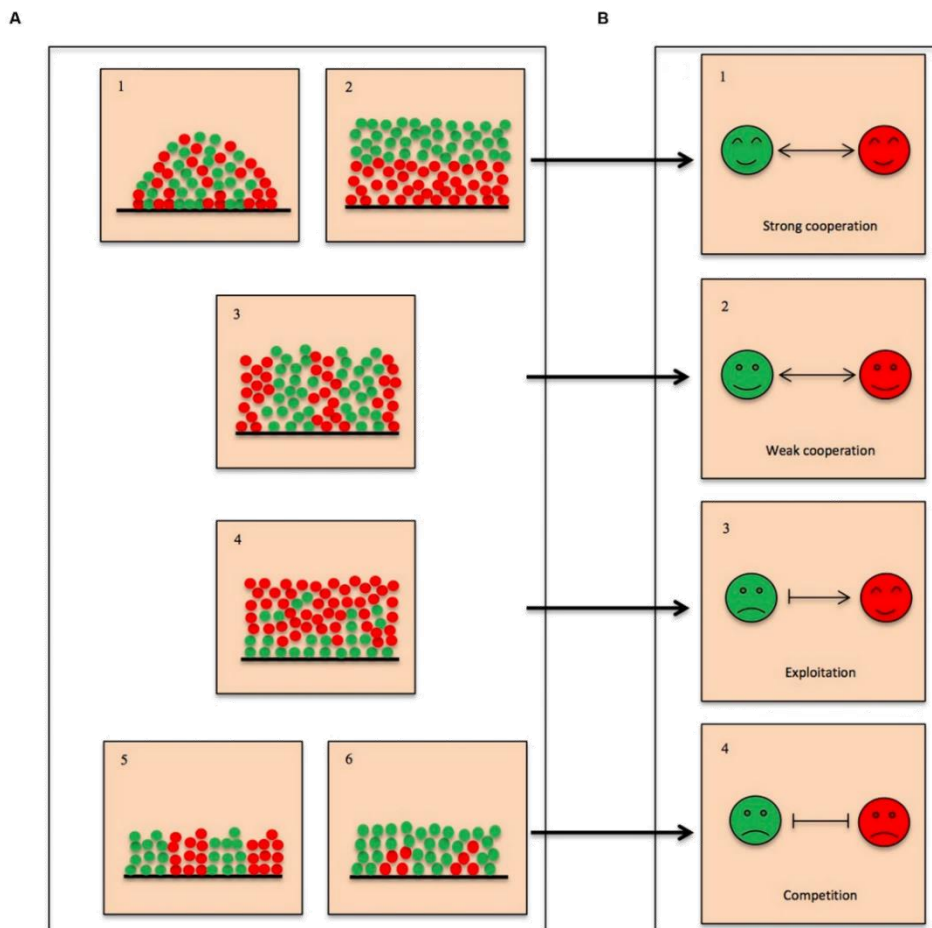


Figura 4. Relación entre organización espacial en biofilms multiespecie e interacciones interespecíficas. (A) Representación de las formas mayoritarias de organización de las especies que forman un biofilm: (1) entremezclado; (2) estructura estratificada; (3, 5) segregación; (4) estructura estratificada con patrones irregulares; (6) patrón irregular **(B)** Tipos de interacciones interespecíficas: (1,2) cooperación; (3) explotación; (4) competición. Las flechas y las barras verticales representan facilitación e inhibición del crecimiento, respectivamente. Figura tomada de [5].

ii. Disminución de la sensibilidad a antimicrobianos

El principal problema asociado a la infección mediada por *biofilms* es la extrema tolerancia que presentan a la acción de antimicrobianos, pudiendo sobrevivir a una concentración hasta 1000 o más veces mayor que las células en estado planctónico, dependiendo del antibiótico [147].

Generalmente, el concepto *resistencia a antimicrobianos* está asociado a un aumento en la concentración mínima inhibitoria (CMI) de una especie bacteriana a un determinado antibiótico. Ésta puede ser intrínseca, es decir, común a todos los miembros de una especie, o adquirida, generalmente mediante transferencia horizontal de material genético entre miembros de la misma o de distinta especie o por mutaciones espontáneas en la diana farmacológica. Existe un último tipo de resistencia, la adaptativa, en el que una bacteria puede expresar un mecanismo de resistencia cuando se expone a dosis subinhibitorias de un antimicrobiano, y revertir a un estado de no-resistencia cuando se retira el estímulo [148]. Por el contrario, el término tolerancia se refiere a la capacidad de un microorganismo de modificar transitoriamente su estado fenotípico para sobrevivir al efecto de un antimicrobiano, sin que esto modifique su CMI. La disminución de la sensibilidad a antimicrobianos en *biofilms* es un fenómeno multicausal en el que tolerancia y resistencia están íntimamente relacionadas. Entre los factores que contribuyen al incremento de la tolerancia a antimicrobianos, cabe destacar:

- i. Disminución de la penetración: reducción o enlentecimiento de la difusión de antimicrobianos (p. ej., aminoglucósidos, polipéptidos) a través del *biofilm* por el establecimiento de interacciones eléctricas con componentes de la matriz extracelular, como el ADN extracelular o el alginato [149-152].
- ii. Inactivación físico-química: disminución de la actividad de determinados antibióticos (p. ej., quinolonas, aminoglucósidos) por las condiciones fisicoquímicas que existen en el interior de los *biofilms*, tales como el ambiente anaeróbico y el pH ácido [153-155].
- iii. Activación de mecanismos de resistencia: regulación positiva de genes que confieren tolerancia a agentes antimicrobianos *biofilm*-específicos, principalmente los que codifican para bombas de expulsión [156-159].
- iv. Indiferencia farmacológica: crecimiento lento de las bacterias que forman el *biofilm*, por lo que los antibióticos que actúan frente a bacterias en estado de división celular (p. ej., los beta-lactámicos) no pueden ejercer su acción [160, 161].

- v. Adaptación al estrés: se produce mediante la diferenciación fenotípica de una subpoblación bacteriana a diferentes estados fisiológicos en los que las dianas terapéuticas están inactivas (*i.e.*, persistentes, VBNC) [162-165].

Asimismo, también se favorece la aparición de mecanismos de resistencia a antimicrobianos *sensu stricto* mediante el intercambio horizontal de material genético entre bacterias gracias a la gran densidad poblacional [166] y la aparición de cepas hipermutadoras [167, 168].

En conjunto, todos estos mecanismos hacen que la antibioterapia a menudo no sea efectiva para la erradicación de *biofilms* a concentraciones tolerables para el cuerpo humano. Además, la diferenciación fenotípica de algunas bacterias al estado fisiológico “persistente” se postula como el principal motivo de recurrencia de las infecciones debido a su capacidad de sobrevivir al efecto bactericida de los antimicrobianos: una vez retirado el tratamiento, el *biofilm* se repuebla a partir de estas subpoblaciones, que además están protegidas del sistema inmunitario del huésped por la matriz [169, 170].

2. Interacciones entre especies

La mayoría de los microorganismos que forman la microbiota respiratoria de los pacientes con FQ se encuentran formando *biofilms* multiespecie [61, 171, 172]. En este ecosistema complejo, se establecen interacciones interespecíficas vía cooperación o competición metabólica y/o *quorum sensing*. Como consecuencia de estas interacciones, que pueden ser sinérgicas o antagónicas, puede modificarse el fenotipo de una especie en particular (p. ej., su distribución espacial, su capacidad de formación de *biofilms* o su respuesta frente a la acción de antimicrobianos y/o del sistema inmunitario del huésped) [5, 146, 173]. Todas estas interacciones terminarán modelando la comunidad microbiana.

En la actualidad, numerosos estudios tratan de reconocer las interacciones interespecíficas que modifican la respuesta a antimicrobianos. En este sentido, son especialmente preocupantes las interacciones que se establecen entre los miembros del microbioma pulmonar en FQ y

disminuyen la sensibilidad de los patógenos clásicos a antimicrobianos, pudiendo contribuir al fallo terapéutico [174-178].

Entre los mecanismos que se han relacionado con la disminución de la respuesta a antimicrobianos cuando una bacteria crece en el contexto de una comunidad, se encuentran:

- i. Producción de enzimas que inactivan a los antimicrobianos por otros microorganismos del consorcio: probablemente, este sea el mecanismo de resistencia más estudiado en este contexto, y se conoce como “patogenicidad indirecta”. El ejemplo más conocido en el contexto de la infección respiratoria crónica es la producción de beta-lactamasas por microorganismos de la microbiota orofaríngea, que se secretan a la matriz del *biofilm* y degradan a los antibióticos beta-lactámicos antes de que puedan alcanzar su diana terapéutica [179-182].
- ii. Variación de la composición de la matriz extracelular: como se ha comentado previamente, la composición de la matriz del *biofilm* varía con la especie [130]. En este sentido, se ha observado que en algunos *biofilms* multiespecie se altera la penetración de antimicrobianos debido a la modificación de la composición de la matriz extracelular, lo que protege al microorganismo diana de la acción de los antimicrobianos [183, 184].
- iii. Modificación de la pared celular: la interacción entre especies también puede tener como consecuencia alteraciones en la pared celular en el microorganismo a tratar, bien mediante el engrosamiento de la misma o bien mediante la modificación de sus componentes, lo que disminuye la respuesta a los antimicrobianos que tengan esta diana terapéutica [175, 185].
- iv. Modificación del metabolismo o del fenotipo: los productos metabólicos excretados por otras especies pueden alterar el fenotipo de una bacteria y/o su metabolismo (p. ej., cambio de metabolismo oxidativo a fermentativo, producción de enzimas frente al estrés oxidativo), lo que incrementa la tolerancia frente a antimicrobianos por interferencia con su actividad [186-188].

Igualmente, se ha observado que la disposición bacteriana en *biofilms* polimicrobianos favorece la transferencia horizontal de material genético entre especies, principalmente aumentando la tasa de conjugación y de transformación, lo que puede terminar modificando la sensibilidad a antimicrobianos de toda una comunidad [189-192].

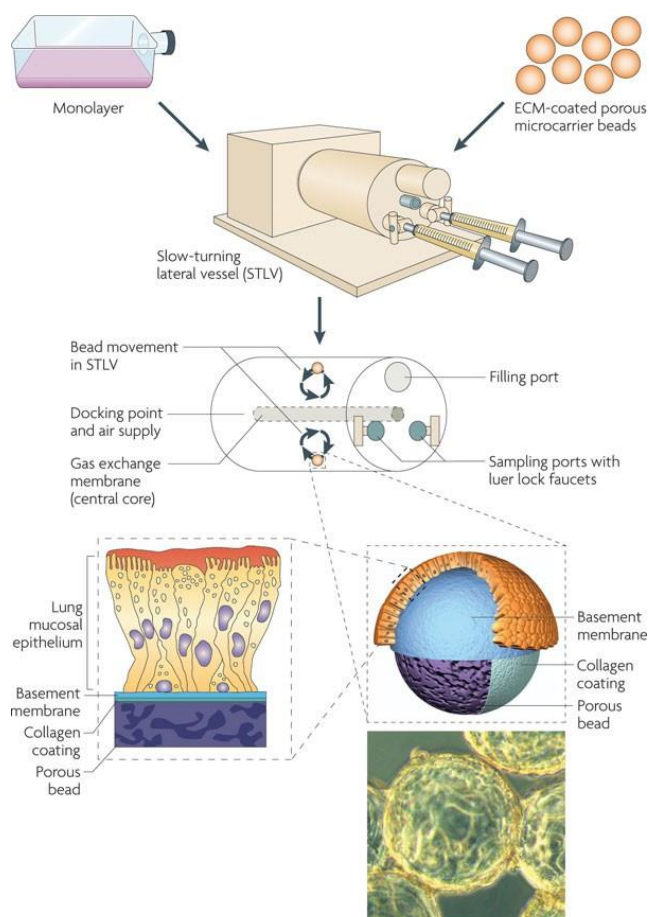
3. Papel de las células del huésped

Definir los mecanismos moleculares y fenotípicos, tanto del huésped como del microorganismo, implicados en un proceso infeccioso ha sido posible en gran medida gracias a los modelos de cultivo celular.

El modelo celular más utilizado es el cultivo en monocapas, en el que las células crecen sobre un sustrato de plástico o cristal. Este modelo ha permitido sentar las bases para la comprensión de la interacción patógeno-hospedador. Sin embargo, las células pierden muchas de sus funciones especializadas cuando son cultivadas en monocapas, principalmente debido a la imposibilidad de mantener su disposición tridimensional nativa [193].

El uso de modelos de cultivo celular tridimensional (3-D) permite evaluar las interacciones patógeno-hospedador que tienen lugar durante el proceso infeccioso en condiciones fisiológicamente relevantes. Los modelos celulares 3-D imitan características fenotípicas y estructurales de las células *in vivo*, tales como la polaridad apico-basal, expresión y distribución fisiológica de uniones estrechas/adherentes, producción de moco, secreción de citoquinas, organización celular y diferenciación en los múltiples tipos celulares que se pueden encontrar *in vivo* [194-197].

Uno de los principales métodos para la realización de estos cultivos se basa en el uso de un biorreactor rotatorio diseñado por la NASA (*National Aeronautics and Space Administration*), lo que permite a las células crecer y diferenciarse mientras recubren microportadores esféricos tapizados con componentes de la matriz extracelular (Figura 5). Una vez diferenciadas, las células se pueden transferir a placas de microtitulación para la realización de los experimentos,



Nature Reviews | Microbiology

Figura 5. Obtención de cultivos celulares tridimensionales de células epiteliales de pulmón usando un biorreactor rotatorio. Una vez alcanzada la confluencia celular en un cultivo en monocapa, se transfieren las células al vaso del biorreactor rotatorio junto con microesferas tapizadas de componentes de la matriz extracelular. La rotación del biorreactor evita la sedimentación de los agregados, que flotan en el medio de cultivo, lo que favorece la creación de las estructuras tridimensionales que se muestran en la imagen. Figura tomada de [6], con permiso.

pudiendo establecer un gran número de condiciones y obtener una gran reproducibilidad de los resultados [198].

Al igual que las interacciones entre microorganismos pueden modificar el fenotipo de una especie en concreto, las interacciones que tienen lugar entre las células del huésped y los patógenos también determinan el fenotipo de un microorganismo. Diversos estudios demuestran que el microambiente presente en el huésped (formado por diversos tipos celulares, componentes

de la matriz extracelular, mucinas, condiciones físicas, y la microbiota residente) modela la fisiología bacteriana, y que las características de las bacterias cocultivadas con agregados celulares 3-D presentan

diferencias con respecto a las cultivadas en monocapas, sugiriendo una mayor similitud con el proceso infeccioso *in vivo* [195-197, 199].

Para poder entender mejor la importancia clínica de los resultados de sensibilidad a antimicrobianos obtenidos *in vitro* es importante imitar el fenotipo bacteriano *in vivo* mediante la incorporación de características clave del lugar de la infección. En el contexto de la FQ, se están comenzando a realizar estudios de sensibilidad a antimicrobianos en presencia de células epiteliales de pulmón que confirman que el microambiente del hospedador influye en la

respuesta a antimicrobianos [200, 201]. Así, los modelos de cultivo celular 3-D se perfilan como métodos útiles tanto para la evaluación del potencial clínico de nuevos agentes antimicrobianos, como para ayudar a comprender la escasa la correlación de la actividad *in vivo-in vitro* observada a veces en FQ.



Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Se establecen dos hipótesis principales:

1. *M. abscessus* y *P. aeruginosa* comparten nicho en el medio ambiente, por lo que los pacientes con FQ podrían infectarse a partir de fuentes ambientales con ambas bacterias. Durante la coinfección, los diferentes ciclos de antimicrobianos dirigidos a tratar a *P. aeruginosa* podrían favorecer la toma del nicho por *M. abscessus* gracias a su resistencia intrínseca a antimicrobianos, mientras que esta última permanecería sin diagnosticar en ausencia de una búsqueda activa. Esto podría contribuir al inicio y desarrollo de la enfermedad pulmonar por *M. abscessus*.
2. La imitación del microambiente del huésped es esencial para que los microorganismos presenten las características fenotípicas que muestran durante la infección *in vivo*. En nuestro caso, creemos que las interacciones con otras especies con las que *M. abscessus* comparte nicho, como *P. aeruginosa*, podrían contribuir al aumento de la tolerancia a antimicrobianos, lo que podría ser uno de los factores que contribuya a la falta de respuesta al tratamiento antimicrobiano observada en los pacientes con enfermedad pulmonar por *M. abscessus*.

Objetivos

1. Objetivo general

Determinar la respuesta de *M. abscessus* a antimicrobianos cuando forma un *biofilm* dual con *P. aeruginosa in vitro* mediante el uso de diferentes modelos.

2. Objetivos específicos

i. Caracterizar el *biofilm* formado por *M. abscessus* y *P. aeruginosa*

Desarrollar diferentes modelos experimentales para la formación de *biofilms* duales de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* utilizando cepas colección y cepas clínicas. Estudiar la supervivencia de *M. abscessus* en un *biofilm* dual con *P. aeruginosa* en ausencia de antibióticos.

ii. Determinar si la respuesta a antimicrobianos se modifica por la existencia de interacciones interespecíficas

Evaluar el efecto antimicrobiano frente al *biofilm* dual de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* y frente a sus respectivos *biofilms* monomicrobianos. Comprobar si la sensibilidad a antimicrobianos utilizados en el contexto de la fibrosis quística de ambos microorganismos se ve afectada por la presencia de la otra especie en las diferentes etapas de la formación del *biofilm* (inhibición y erradicación del *biofilm*).

iii. Evaluar el papel de la interacción patógeno-huésped en la respuesta a antimicrobianos

Evaluar mediante el uso de modelos fisiológicamente relevantes, como cultivos celulares tridimensionales de células epiteliales de pulmón, si la interacción patógeno-huésped puede afectar a la sensibilidad a antimicrobianos de ambas bacterias comparado con otros ensayos *in vitro* que no incorporan elementos del huésped.

iv. Determinar el efecto del tratamiento antipseudomónico en la supervivencia de *M. abscessus* en el *biofilm* dual

Determinar si la exposición *in vitro* a antimicrobianos empleados habitualmente para el tratamiento de la infección por *P. aeruginosa* en el contexto de la fibrosis quística tiene como consecuencia la disminución de la densidad bacteriana *P. aeruginosa* y el aumento de supervivencia de *M. abscessus* en las diferentes etapas de la formación de un *biofilm* dual utilizando diferentes modelos experimentales.



Trabajos de investigación

Caracterización del biofilm dual formado por *Mycobacterium abscessus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Contexto: la enfermedad respiratoria en FQ se caracteriza por formación de *biofilms* polimicrobianos en el tracto respiratorio. Entre los patógenos que están asociados con una disminución de la función pulmonar se encuentra *M. abscessus*, cuya incidencia ha aumentado en los últimos años. Sin embargo, poco se sabe acerca de su capacidad de formación de *biofilms* con otras especies. En este artículo, desarrollamos un modelo para estudiar las características fenotípicas del *biofilm* dual formado por *M. abscessus* y *P. aeruginosa*, patógenos habitualmente coaislados.

Material y métodos: se formaron *biofilms* monomicrobianos y duales con cepas clínicas y colección de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* en membranas de policarbonato. Para ello, se utilizó una concentración variable de *M. abscessus* y otra fija de *P. aeruginosa* y se incubaron durante 24, 48 o 72h. Después, los *biofilms* se desprendieron de las membranas mediante vorteo-sonicación y la población de cada bacteria fue cuantificada mediante recuento en medios específicos. Finalmente, en una prueba de concepto, se evaluó la sensibilidad de *biofilms* duales y monomicrobianos a claritromicina.

Resultados: la concentración empleada para la formación de los *biofilms* tuvo efecto en la población de *M. abscessus* en el *biofilm* dual sólo a las 24 y a las 48h. El tiempo de cultivo incrementó la formación de *biofilm* de ambas especies, especialmente entre las 24 y las 48h. Se encontró una disminución significativa en la población de *M. abscessus* en *biofilms* duales en comparación con sus respectivos *biofilms* monomicrobianos. No se observó una modificación de la sensibilidad de *M. abscessus* a claritromicina cuando creció en *biofilms* duales con *P. aeruginosa*.

Conclusiones: según los resultados, las condiciones para producir un *biofilm* dual en el que la distribución relativa de especies sea estable son 72 h de crecimiento del cultivo microbiano mixto en una proporción 1:1. Además, la interacción que se establece entre *P. aeruginosa* y *M. abscessus* es una explotación, en la que *M. abscessus* es la bacteria explotada.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Medical Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijmm

Non-Tuberculous Mycobacteria multispecies biofilms in cystic fibrosis: development of an *in vitro* *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa* dual species biofilm model

Graciela Rodríguez-Sevilla^{a,*}, Marta García-Coca^a, David Romera-García^a, John Jairo Aguilera-Correa^a, Ignacio Mahillo-Fernández^b, Jaime Esteban^a, Concepción Pérez-Jorge^a

^a Department of Clinical Microbiology, IIS- Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain

^b Department of Epidemiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Mycobacterium abscessus
Pseudomonas aeruginosa
 Multispecies biofilms
 Cystic fibrosis
 Sociomicrobiology

ABSTRACT

Lung disease in cystic fibrosis (CF) is characterized by the progressive colonization of the respiratory tract by different bacteria, which develop polymicrobial biofilms. In the past decades, there has been an increase in the number of CF patients infected with Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM). Although *Mycobacterium abscessus* is the main NTM isolated globally, little is known about *M. abscessus* multispecies biofilm formation. In the present study we developed an *in vitro* model to study the phenotypic characteristics of biofilms formed by *M. abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa*, a major pathogen in CF. For that purpose, dual species biofilms were grown on polycarbonate membranes with a fixed concentration of *P. aeruginosa* and different inoculums of *M. abscessus*. The biofilms were sampled at 24, 48, and 72 h and bacteria were quantified in specific media. The results revealed that the increasing initial concentration of *M. abscessus* in dual species biofilms had an effect on its population only at 24 and 48 h, whereas *P. aeruginosa* was not affected by the different concentrations used of *M. abscessus*. Time elapsed increased biofilm formation of both species, specially between 24 and 48 h. According to the results, the conditions to produce a mature dual species biofilm in which the relative species distribution remained stable were 72 h growth of the mixed microbial culture at a 1:1 ratio. A significant decrease in mycobacterial population in dual compared to single species biofilms was found, suggesting that *P. aeruginosa* has a negative influence on *M. abscessus*. Finally, in a proof of concept experiment, young and mature dual species biofilms were exposed to clarithromycin.

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive genetic disorder affecting caucasians (Davies et al., 2007). Lung disease in CF is characterized by the progressive colonization of the respiratory tract by different pathogenic bacteria, which persist due to an impaired ciliary function and increased mucus viscosity, and can cause polymicrobial biofilm-mediated infections in the lower airways (Bhagirath et al., 2016; Burmolle et al., 2010; Burmolle et al., 2014; Peters et al., 2012; Robinson and Bye 2002). These infections seem to be the main stimulus for an exacerbated inflammatory response that causes permanent damage to the lung architecture and function (Bedrossian et al., 1976; Burmolle et al., 2010).

The most frequent isolates from respiratory samples of CF patients

include *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae*, with *P. aeruginosa* causing the most predominant lung infection (Bhagirath et al., 2016). However, this list excludes members of the CF lung environment that are not regularly screened in the clinical laboratory (Peters et al., 2012; Sibley and Surette 2011).

Non-tuberculous mycobacteria (NTM) are ubiquitous organisms that can cause chronic lung infection in susceptible patients. In the past decades there has been an increase in the incidence of NTM-positive cultures from respiratory samples of CF patients, although a precise determination of the incidence and prevalence of NTM lung disease is difficult because disease reporting is generally not mandatory.

The main NTM isolated globally is *Mycobacterium abscessus* (Binder et al., 2013; Koh et al., 2017; Prevots and Marras 2015; Stout et al., 2016), despite the fact that the epidemiology of NTM is linked to a

* Corresponding author.

E-mail address: graciela.rodriguez@fjd.es (G. Rodríguez-Sevilla).

<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.03.003>

Received 2 November 2017; Received in revised form 17 February 2018; Accepted 5 March 2018
 1438-4221/ © 2018 Elsevier GmbH. All rights reserved.

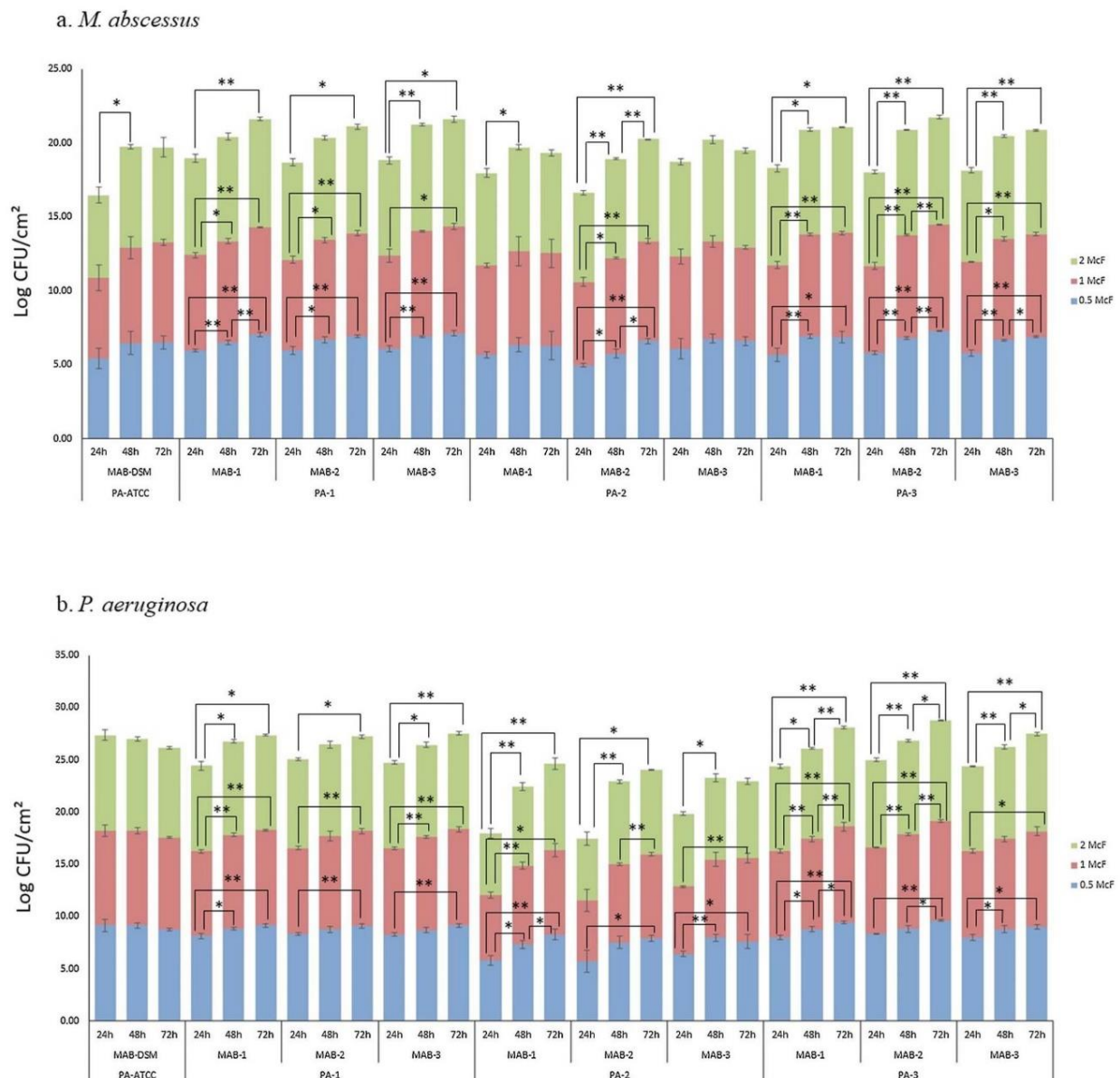


Fig. 1. Effect of time on *M. abscessus* and *P. aeruginosa* dual species biofilms.

Effect of time elapsed of biofilm formation on: a) *M. abscessus* (MAB) and b) *P. aeruginosa* (PA) when developing dual species biofilms with different inoculums of *M. abscessus* (0.5, 1 and 2 McF). *Statistically significant: $p \leq 0.05$ ** Statistically significant: $p \leq 0.01$ (Data shown are average; $n \geq 3$; error bars indicate SD)

substantial geographical variation (Nagano et al., 2017). CF patients infected with *M. abscessus* are associated with increased morbidity and mortality, as well as with a rapid decline in lung function (Esther et al., 2005; Esther et al., 2010; Qvist et al., 2016). Indeed, patients with positive *M. abscessus* cultures are more likely to meet the criteria of the ATS/IDSA guidelines for the diagnosis of NTM lung disease than when infected with other NTM, such as *Mycobacterium avium* complex (Floto et al., 2016; Griffith et al., 2007).

Treatment of *M. abscessus* lung infection is particularly challenging, as it is intrinsically resistant to most antimicrobials (Floto et al., 2016; Griffith et al., 2007; Koh et al., 2017), including those commonly employed to treat lung infection in CF, as well as their doses (Waters and Rajten, 2016).

For NTM recovery by microbiological culture a suitable

decontamination technique is required, but usually fails in individuals with cystic fibrosis given the high density of *P. aeruginosa* and other microorganisms (Buijtelts and Petit 2005; De Bel et al., 2013; Oliver et al., 2001; Whittier et al., 1993). In fact, different studies have described that CF patients in which NTM were isolated were coinfecting with microorganisms like *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Aspergillus fumigatus* (Levy et al., 2008; Melloul et al., 2016; Viviani et al., 2016).

M. abscessus biofilm formation in the respiratory zone of the lungs of CF patients has been demonstrated (Qvist et al., 2015). Nowadays is known that biofilm communities tend to be polymicrobial, however, little is known about *M. abscessus* multispecies biofilm formation. In this study, we developed an *in vitro* model to study the dual species biofilm formed by *M. abscessus* and a major CF pathogen (i.e., *P. aeruginosa*).

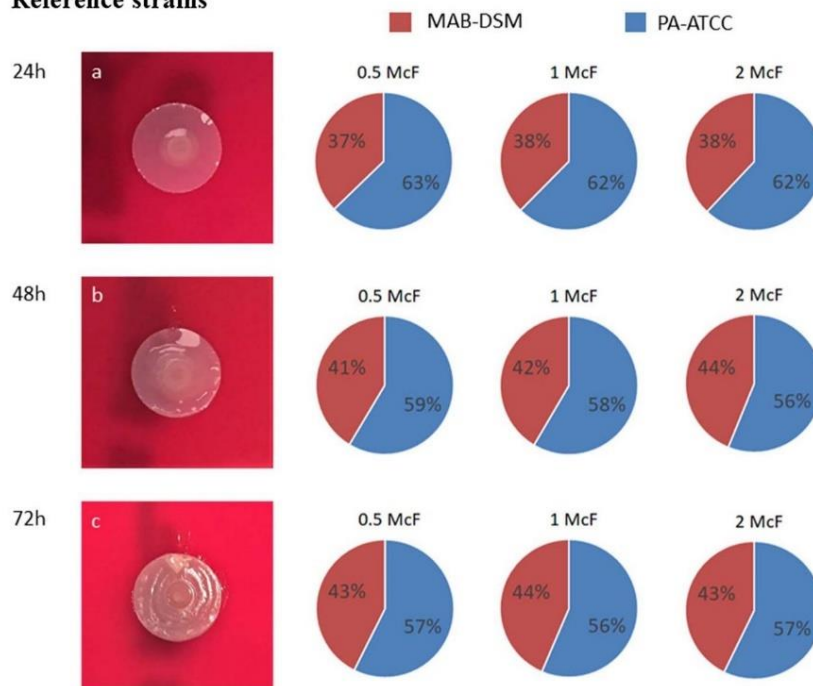
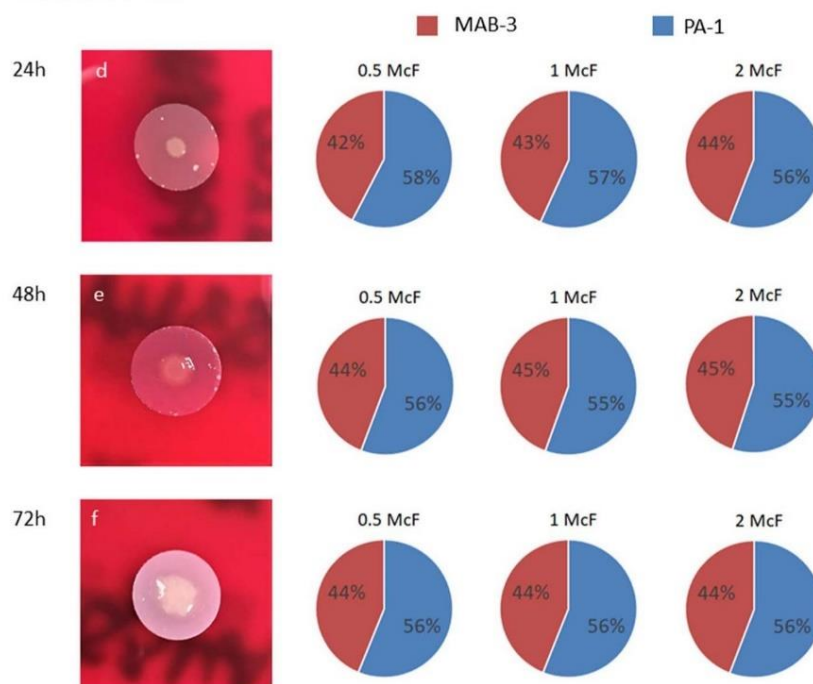
Reference strains**Clinical strains**

Fig. 2. Macroscopic evolution of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* dual species biofilms and changes in community composition over time.

M. abscessus and *P. aeruginosa* dual species biofilms (a-f) grown on polycarbonate membranes in TSS for 24 h, 48 h and 72 h. Pictures a-c represent dual species biofilm formation with the reference strains *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *M. abscessus* DSM 44196 (MAB-DSM/PA-ATCC), while pictures d-f represent dual species biofilm formation with the clinical strains MAB-1/PA-3. Next to the biofilm images, three graphics showing the impact of the different inoculums of *M. abscessus* used for growing the dual species biofilms (0.5; 1 and 2 McF) on community composition are shown at each time point.

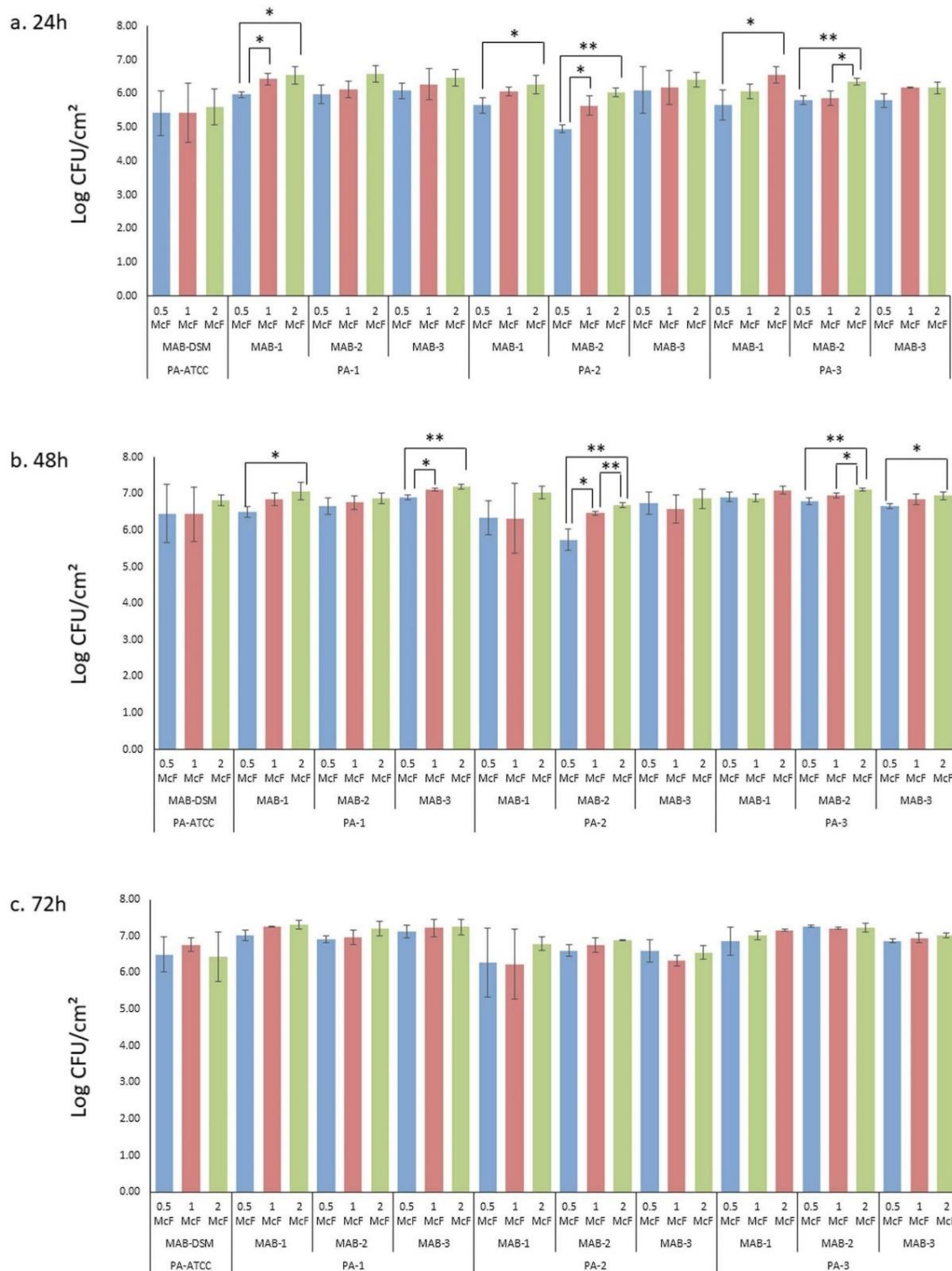


Fig. 3. Effect of *M. abscessus* inoculum on the log CFU/cm² of *M. abscessus* in dual species biofilms.

Effect of *M. abscessus* (MAB) initial concentration (1.5×10^8 , 3×10^8 or 6×10^8 CFU/mL) on *M. abscessus* number when developing dual species biofilms with *P. aeruginosa* (PA) at 24 (a), 48 (b) and 72 (c) hours. * Statistically significant: $p \leq 0.05$ ** Statistically significant: $p \leq 0.01$ (Data shown are average; $n \geq 3$; error bars indicate SD)

Table 1

Average number (log CFU/cm² ± SD) of *P. aeruginosa* in single species biofilms at 24, 48 and 72 h.

	PA-ATCC	PA-1	PA-2	PA-3
24h	9.21 ± 0.10	8.01 ± 0.35	5.75 ± 0.29	8.17 ± 0.18
48h	9.48 ± 0.09	8.57 ± 0.13	7.86 ± 0.02	8.38 ± 0.09
72h	9.49 ± 0.12	8.71 ± 0.18	7.47 ± 0.40	9.06 ± 0.14

Our objective is to study the influence of *P. aeruginosa* on *M. abscessus* biofilm formation at different time points (24, 48 and 72 h) and with different *M. abscessus* inoculums, and to determine the community structure. Once standardized this technique, further studies will be done to determine the role, if any, of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* interspecies interactions in susceptibility to antibiotics.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Two different types of strains were used: two reference strains, *M. abscessus* subsp. *abscessus* DSM 44196 (MAB-DSM) and *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PA-ATCC), and 3 clinical strains of each species. *P. aeruginosa* clinical strains (PA-1, PA-2 and PA-3) were isolated from respiratory samples of chronically infected CF patients. All of these strains presented a mucoid phenotype. *M. abscessus* subsp. *abscessus* (MAB-1, MAB-2) and *M. abscessus* subsp. *massiliense* (MAB-3) clinical strains were isolated from respiratory samples of patients with bronchiectasis (García-Pedrazuela et al., 2015). All of them presented a smooth colony phenotype and were clinically significant according to the ATS/IDSA guidelines (Griffith et al., 2007).

2.2. Ethics statement

All the clinical strains were collected from respiratory samples as part of diagnostic or routine procedures and were processed in the clinical microbiology department. The de-identified clinical strains used for this study did not require formal Human Ethics Committee approval or Informed Patient Consent.

2.3. Biofilm formation

P. aeruginosa and *M. abscessus* dual species biofilms were grown according to the method described by Anderl et al. (Anderl et al., 2000), with minor modifications. *P. aeruginosa* cultures were grown overnight in tryptic soy broth (TSB) at 37 °C, centrifuged 10 min at 3500 rpm,

Table 3

Average number (log CFU/cm² ± SD) of *M. abscessus* in single species biofilms at 24, 48 and 72 h with different inoculums.

	MAB-DSM	MAB-1	MAB-2	MAB-3
0.5 McF				
24h	6.05 ± 0.10	5.58 ± 0.48	6.09 ± 0.40	5.75 ± 0.53
48h	8.26 ± 0.23	7.50 ± 0.33	7.92 ± 0.14	8.13 ± 0.07
72h	9.11 ± 0.13	8.48 ± 0.28	8.60 ± 0.16	8.87 ± 0.12
1 McF				
24h	5.89 ± 0.20	6.26 ± 0.25	6.29 ± 0.33	6.58 ± 0.37
48h	8.40 ± 0.23	7.92 ± 0.15	8.12 ± 0.03	8.35 ± 0.28
72h	8.96 ± 0.35	8.72 ± 0.16	8.72 ± 0.08	8.85 ± 0.13
2 McF				
24h	6.32 ± 0.35	6.51 ± 0.49	6.37 ± 0.33	6.80 ± 0.40
48h	8.32 ± 0.26	7.99 ± 0.29	8.17 ± 0.18	8.48 ± 0.11
72h	9.14 ± 0.11	8.88 ± 0.17	8.68 ± 0.19	8.94 ± 0.13

washed three times with sterile phosphate buffer (PBS) and then diluted to a 0.5 McFarland (McF) ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL). *M. abscessus* cultures were grown in tryptic soy agar supplemented with 5% sheep blood (TSS, bioMérieux[®]) for 72 h, and then suspended and diluted in PBS to obtain a 0.5 McF ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL), 1 McF ($\sim 3 \times 10^8$ CFU/mL) and 2 McF ($\sim 6 \times 10^8$ CFU/mL). Autoclaved (15 min, 121 °C), white, polycarbonate membranes (diameter, 13 mm; pore size 0.2 µm) were placed on TSS plates and inoculated with 2 µl of the 0.5 McF solution of *P. aeruginosa* together with 2 µl of each solution (0.5; 1 or 2 McF) of *M. abscessus*. Single species biofilms of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* were included for each condition. The plates were incubated at 37 °C, in a 5% CO₂ atmosphere, for 24, 48 or 72 h. The membrane-supported biofilms were transferred to fresh culture medium every 24 h. The dual species biofilms were formed with the reference strains (MAB-DSM/PA-ATCC) and with all the possible combinations of the clinical strains (MAB-1/PA-1, MAB-1/PA-2, MAB-1/PA-3, MAB-2/PA-1, MAB-2/PA-2, MAB-2/PA-3, MAB-3/PA-1, MAB-3/PA-2, MAB-3/PA-3).

2.4. Biofilm quantification

The biofilms were sampled at 24, 48, and 72 h. When sampled, each membrane-supported biofilm was placed in 10 ml of PBS, vortexed 30 s, sonicated for 2 min and vortexed again for 30 s. Culturable bacteria were quantified by drop plating serially diluted samples onto two selective media (MacConkey Agar and Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood, both from bioMérieux[®]). *P. aeruginosa* colonies were counted in MacConkey agar after 24 h of incubation, whereas *M. abscessus* colonies were counted in CNA agar after 72 h.

Table 2

Average number (log CFU/cm² ± SD) of *P. aeruginosa* in dual species biofilms at 24, 48 and 72 h with different *M. abscessus* inoculum suspensions. *Significantly different from single species biofilm ($p \leq 0.05$). **Significantly different from single species biofilm ($p \leq 0.01$).

	PA-ATCC	PA-1	PA-2	PA-3
	MAB-DSM	MAB-1	MAB-2	MAB-3
0.5 McF				
24h	9.15 ± 0.58	8.16 ± 0.26	8.32 ± 0.13	8.28 ± 0.15
48h	9.15 ± 0.25	8.86 ± 0.14	8.78 ± 0.29	8.71 ± 0.28
72h	8.77** ± 0.12	9.15* ± 0.17	9.08 ± 0.20	9.14* ± 0.18
1 McF				
24h	9.03 ± 0.56	8.08 ± 0.19	8.23 ± 0.16	8.25 ± 0.12
48h	9.08 ± 0.31	8.94* ± 0.16	8.94 ± 0.44	8.89 ± 0.13
72h	8.77** ± 0.09	9.12* ± 0.06	9.10 ± 0.28	9.22* ± 0.26
2 McF				
24h	9.16 ± 0.49	8.20 ± 0.43	8.50 ± 0.13	8.20 ± 0.19
48h	8.76** ± 0.21	8.95* ± 0.15	8.72 ± 0.35	8.81 ± 0.25
72h	8.62** ± 0.12	9.08* ± 0.09	9.03 ± 0.16	9.16* ± 0.17

Table 4
Average number (log CFU/cm² ± SD) of *M. abscessus* in dual species biofilms at 24, 48 and 72 h with different *M. abscessus* inoculum suspensions. *Significantly different from single species biofilm ($p \leq 0.05$). **Significantly different from single species biofilm ($p \leq 0.01$).

	MAB-DSM			MAB-1			MAB-2			MAB-3		
	PA-ATCC	PA-1	PA-2	PA-3	PA-2	PA-1	PA-2	PA-3	PA-1	PA-2	PA-3	
0.5 McF												
24h	5.43 ± 0.66	5.97 ± 0.08	5.65 ± 0.23	5.67 ± 0.45	5.65 ± 0.23	5.98 ± 0.28	4.95** ± 0.12	5.81 ± 0.13	6.08 ± 0.23	6.11 ± 0.69	5.80 ± 0.20	
48h	6.46* ± 0.80	6.51** ± 0.14	6.34* ± 0.48	6.92* ± 0.13	6.34* ± 0.48	6.68** ± 0.22	5.75** ± 0.30	6.80** ± 0.10	6.91** ± 0.07	6.75** ± 0.30	6.68** ± 0.06	
72h	6.50** ± 0.47	7.02** ± 0.14	6.29* ± 0.95	6.88** ± 0.39	6.29* ± 0.95	6.92** ± 0.09	6.61** ± 0.16	7.28** ± 0.03	7.13** ± 0.17	6.60** ± 0.32	6.88** ± 0.05	
1 McF												
24h	5.44 ± 0.88	6.44 ± 0.17	6.06 ± 0.13	6.07 ± 0.22	6.06 ± 0.13	6.13 ± 0.23	5.64 ± 0.29	5.87 ± 0.22	6.28 ± 0.46	6.19 ± 0.51	6.18 ± 0.02	
48h	6.44* ± 0.74	6.85** ± 0.18	6.33* ± 0.96	6.89** ± 0.12	6.33* ± 0.96	6.76** ± 0.18	6.47** ± 0.05	6.96** ± 0.07	7.13* ± 0.05	6.59** ± 0.37	6.85** ± 0.14	
72h	6.77** ± 0.19	7.27** ± 0.02	6.24* ± 0.95	7.03** ± 0.12	6.24* ± 0.95	6.98** ± 0.20	6.75** ± 0.20	7.22** ± 0.02	7.23** ± 0.23	6.34** ± 0.14	6.96** ± 0.12	
2 McF												
24h	5.61 ± 0.52	6.55 ± 0.26	6.26 ± 0.28	6.56 ± 0.24	6.26 ± 0.28	6.59 ± 0.25	6.03 ± 0.13	6.35 ± 0.10	6.47 ± 0.23	6.42 ± 0.22	6.17 ± 0.17	
48h	6.84** ± 0.15	7.07* ± 0.24	7.04** ± 0.17	7.10** ± 0.11	7.04** ± 0.17	6.88** ± 0.15	6.69** ± 0.06	7.13** ± 0.03	7.20** ± 0.08	6.87** ± 0.27	6.95** ± 0.10	
72h	6.44** ± 0.68	7.32** ± 0.12	6.80** ± 0.20	7.16** ± 0.03	6.80** ± 0.20	7.21** ± 0.19	6.90** ± 0.02	7.24** ± 0.11	7.25** ± 0.22	6.56** ± 0.19	7.03** ± 0.06	

2.5. Microscopic analysis of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* dual species biofilms

Black, polycarbonate membranes (diameter, 25 mm; pore size 0.2 µm) were inoculated with *P. aeruginosa* and *M. abscessus* (MAB-DSM/PA-ATCC) in a proportion 1:1 and incubated for 24 h. Then, two different microscopic techniques were employed in order to study the spatial distribution of the biofilms: a histologic-based microscopic study and confocal scanning laser microscopy (CSLM). For the histologic-based microscopic study, dual species colony-biofilms were immersed in Richard-Allan Scientific™ Neg-50™ Frozen section medium (Thermo Scientific, USA) and frozen in liquid nitrogen. Longitudinal sections of 20 µm were made using a cryostat at −20 °C and placed on Superfrost™ Plus microscope slides (Thermo Scientific, USA). The samples were then fixed with methanol, stained using Ziehl-Neelsen (ZN) stain to differentiate *M. abscessus* (ZN positive) and *P. aeruginosa* (ZN negative), and studied using light microscopy imaging. For CSLM, dual species colony-biofilms were frozen at −80 °C for 30 min and fixed using 4 °C-tempered Formalin 10%, neutral buffered, Wintergreen Scented solution (Sigma-Aldrich, USA) for 3 h. Then, biofilms were stained using: (1) Auramine-rhodamine to visualize acid-fast organisms (*M. abscessus*) and disrupt the membranes of non-acid-fast organisms (*P. aeruginosa*), and (2) Propidium iodide (Applied biosystems, Thermofisher, USA), which binds to DNA of non-viable cells, to visualize *P. aeruginosa*. After staining, the biofilms were placed on a 35 mm glass bottom µ-dish (Ibidi, Martinsried, Germany) and analyzed using a Leica DM IRB confocal laser-scanning microscope (Leica, Germany).

2.6. Proof of concept: biofilm eradication with clarithromycin

The biofilms were exposed to antibiotic treatment according to the method described by Anderl et al. (Anderl et al., 2000). Briefly, biofilms were grown on polycarbonate membranes with reference (PA-ATCC, MAB-DSM) and clinical (MAB-3, PA-1) strains of *P. aeruginosa* and *M. abscessus*, alone and combined in a proportion 1:1. After 24 (i.e., young biofilms) or 72 h (i.e., mature biofilms) of incubation, biofilms were transferred to Antibiotic Medium 2 agar (BD Difco™) without antibiotic or supplemented with clarithromycin at a concentration of 10x *M. abscessus* MIC (Cla, 0.3 µg/mL). Biofilm quantification was carried out after 24 h of treatment. Log eradication was calculated by subtracting the log surviving bacteria after treatment from the corresponding log control bacteria.

2.7. Statistical analysis

All the experiments were performed at least in biological triplicate. The normal distribution of the data was assessed using the Shapiro-Wilk test. The means of the log CFU/cm² for each experiment were compared with an ANOVA test when the number of conditions was more than two. If the comparison was made between two conditions, then an independent-sample *t*-test was performed. Statistical significance was considered when *p*-value was less than or equal to 0.05.

3. Results

3.1. Comparison of *M. abscessus* growth in general and selective media

Before making the study, the recovery of *M. abscessus* in non-selective (TSS) and selective media (CNA agar) was compared. For that purpose, a 0.5 McF suspension of *M. abscessus* DSM 44196 was used and serial dilutions were made to calculate the CFU/mL in each media. The results showed that the percentage of recovery in CNA following 72 h of incubation was 99.7% when compared to the recovery in TSS.

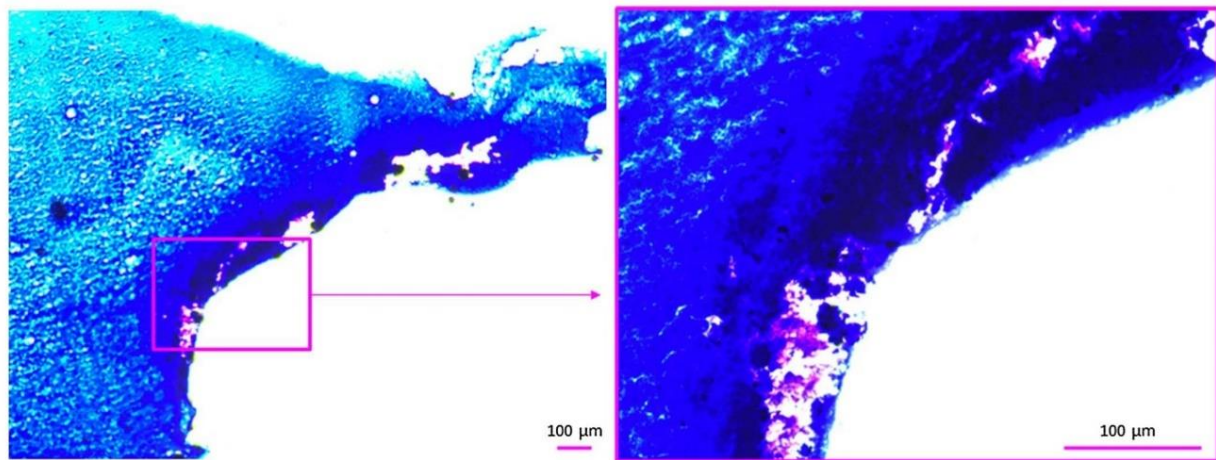


Fig. 4. Internal structure of a *P. aeruginosa* and *M. abscessus* dual species biofilm.

In the left, an image of a longitudinal section of the dual species biofilm is presented at a magnification of 50x, where the layered structure of the community can be observed. Microcolonies of *M. abscessus* (pink) were mostly restricted to the inner zone of the biofilm, just above the membrane, while *P. aeruginosa* (blue) grew abundantly towards the upper layers. In the right image, a more detailed view (200×) of the structure is shown. For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

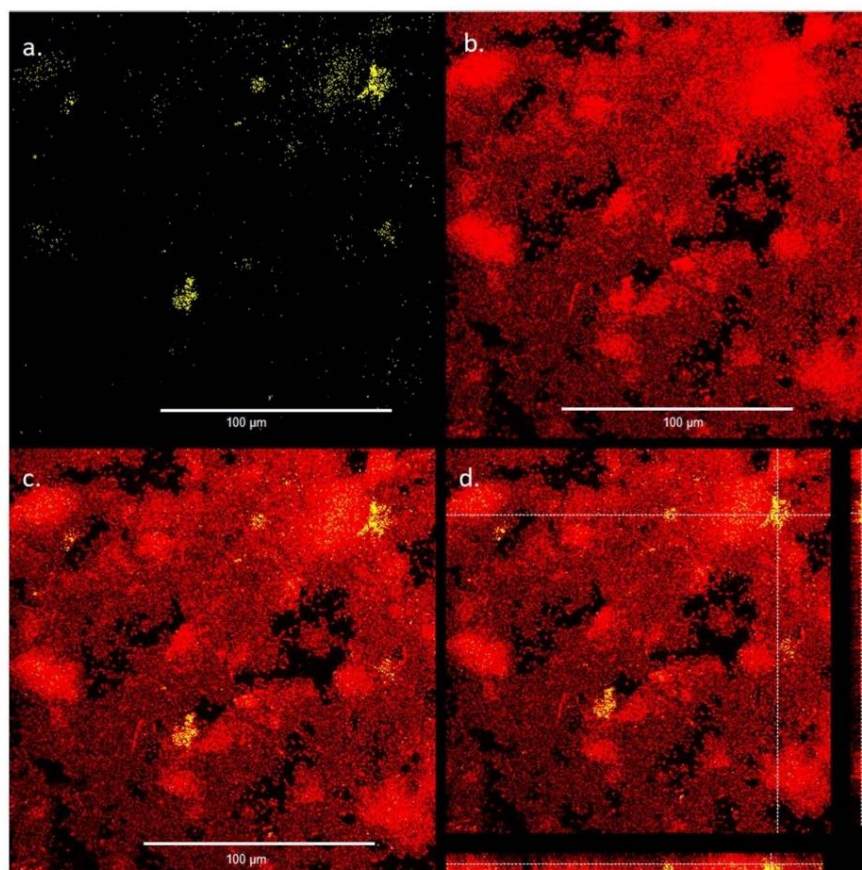
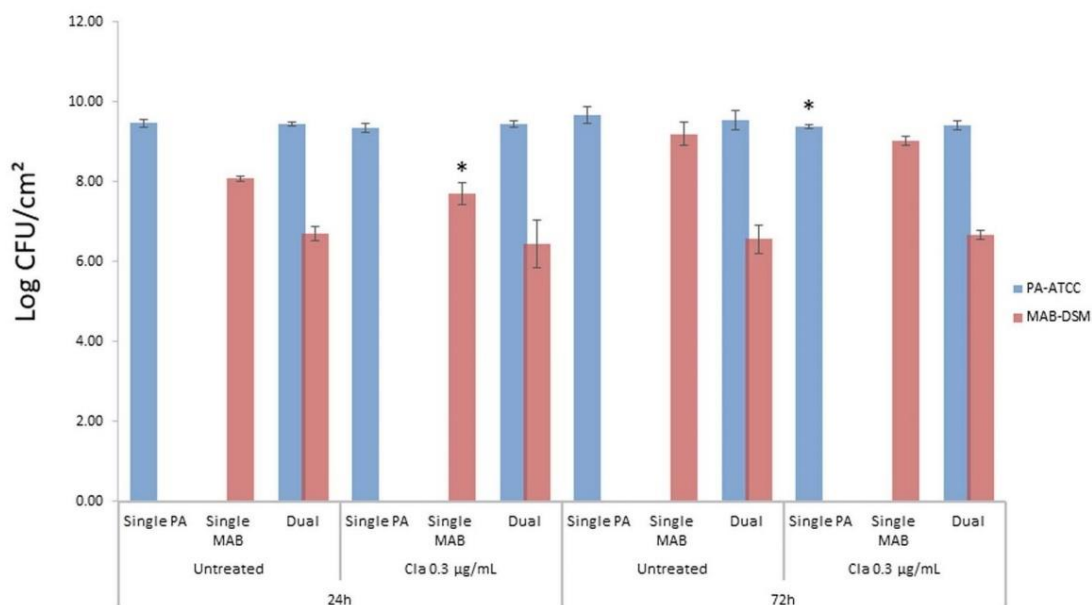


Fig. 5. Confocal scanning laser microscopy of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* dual species biofilms.

24 h grown *M. abscessus* and *P. aeruginosa* dual species biofilms were observed using CLSM with a 40x oil objective. In the image, microcolonies of *M. abscessus* (a, yellow cells) are covered by *P. aeruginosa* (b, red cells). A combination of both images (c) is shown. Picture d shows both a vertical (down) and horizontal (right) profile view of a *M. abscessus* microcolony (signaled) surrounded by *P. aeruginosa* cells.

a. Reference strains



b. Clinical strains

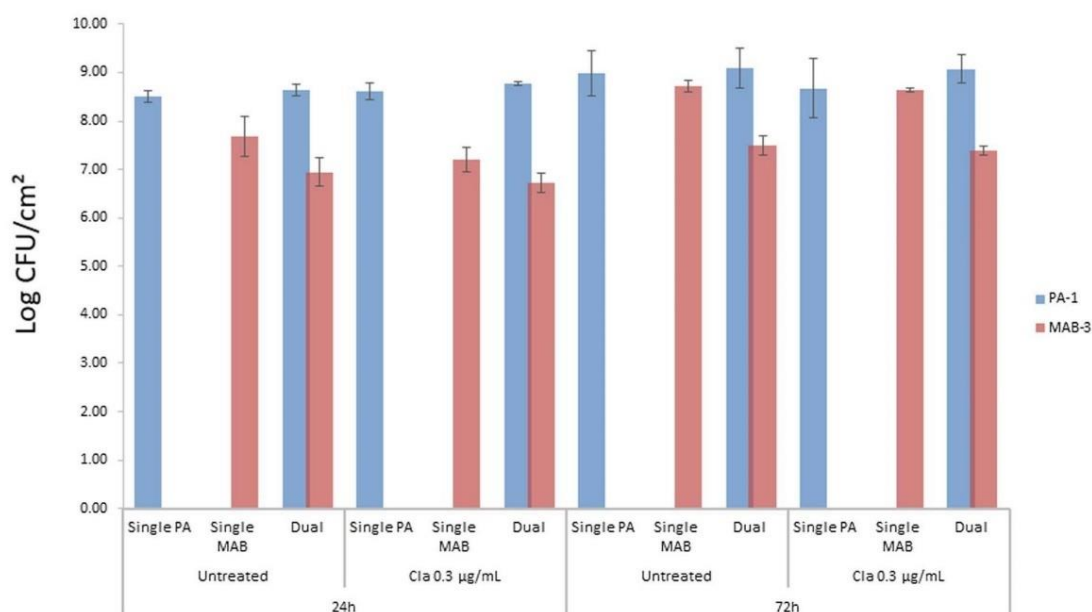


Fig. 6. Eradication of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* single and dual species biofilms with clarithromycin.

Eradiation of biofilm formation was assessed based on the number of bacteria grown on the membranes in single and dual cultures of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* MAB-DSM/PA-ATCC (a) and MAB-3/PA-1 (b) in the presence or absence of clarithromycin (cla), *p < 0.05 when comparing a treated organism to its control without antibiotic (Data shown are average; n ≥ 3; error bars indicate SD).

3.2. Influence of time on dual species biofilm formation

An increase on *M. abscessus* and *P. aeruginosa* log CFU/cm² in dual species biofilms was observed after increasing time elapsed of biofilm formation at all the ratios tested. The results together with the statistical significance are summarized in Fig. 1, while the macroscopic

evolution of the dual species biofilms together with the changes in community composition over time is shown on Fig. 2.

Statistically significant differences were appreciated when the log CFU/cm² of *M. abscessus* in dual species biofilms was compared between different time points in all the combinations, except MAB-3/PA-2 at all the ratios tested (p > 0.05), and MAB-DSM/PA-ATCC and MAB-

1/PA-2 when the initial concentrations of *M. abscessus* were 1.5×10^8 and 3×10^8 CFU/mL ($p > 0.05$). Statistically significant differences were mainly found between 24 and 48 h and between 24 and 72 h ($p \leq 0.05$).

3.3. Influence of *M. abscessus* initial concentration on biofilm formation at different time points

M. abscessus single species biofilm formation was not influenced by the initial concentration of this organism at any time investigated (24, 48 and 72 h, $p > 0.05$). Nevertheless, changes in the inoculum of *M. abscessus* had a statistically significant impact on *M. abscessus* log CFU/cm² in dual species biofilms. The results together with the statistical significance are summarized in Fig. 3.

P. aeruginosa log CFU/cm² in dual species biofilms was only affected by the different inoculums of *M. abscessus* in the combination MAB-3/PS-2 at 24 h, showing a significant increase in its number when comparing the log CFU/cm² obtained between 1.5×10^8 and 3×10^8 CFU/mL ($p \leq 0.05$), and 3×10^8 and 6×10^8 CFU/mL ($p \leq 0.01$).

3.4. Comparison of single vs dual species biofilms

The log CFU/cm² of single and dual species biofilms of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* is shown on Tables 1–4.

At 24 h, there were differences in the number of bacteria in single compared to dual species biofilms in the combinations MAB-2/PA-2 and MAB-3/PA-2. In MAB-2/PA-2, *M. abscessus* reduced its number when developing a dual species biofilm with *P. aeruginosa* at a concentration of 1.5×10^8 CFU/mL ($p \leq 0.01$). Meanwhile, in MAB-3/PA-2, *P. aeruginosa* increased its number when grown with *M. abscessus* at any concentration ($p \leq 0.05$).

At 48 h, a reduction in the log CFU/cm² of *M. abscessus* was observed when developing dual species biofilms with *P. aeruginosa*, compared to its single species biofilms, at all the concentrations ($p \leq 0.05$). Significant differences between single and dual species biofilms of *P. aeruginosa* were also observed: *P. aeruginosa* increased its number when growing together with *M. abscessus* in the combinations MAB-1/PA-1 (concentrations 3×10^8 and 6×10^8 CFU/mL; $p \leq 0.05$), MAB-1/PA-3 (1.5×10^8 and 6×10^8 CFU/mL, $p \leq 0.05$), MAB-2/PA-3 (3×10^8 and 6×10^8 CFU/mL $p \leq 0.01$) and MAB-3/PA-3 (6×10^8 CFU/mL, $p \leq 0.05$). In the combinations MAB-DSM/PA-ATCC and MAB-2/PA-2, *P. aeruginosa* reduced its number when growing in a biofilm with *M. abscessus* (6×10^8 and 3×10^8 CFU/mL, $p \leq 0.01$).

At 72 h, *M. abscessus* log CFU/cm² in dual species biofilms was reduced, compared to single species biofilms, at all the concentrations ($p \leq 0.01$). In the combinations MAB-1/PA-1, MAB-1/PA-3, MAB-2/PA-3 and MAB-3/PA-1, the log CFU/cm² of *P. aeruginosa* in dual species biofilms was higher than in single species biofilms ($p \leq 0.05$). However, in the study with the laboratory strains, a decrease of *P. aeruginosa* number in the dual species biofilm was seen at all ratios tested ($p \leq 0.01$).

3.5. Spatial organization of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* dual species biofilms

In order to have a better understanding of both the community structure and the colony-biofilm architecture, CSLM and histologic-based microscopic studies were carried out. The internal architecture of the dual species biofilm is shown on Fig. 4, where a longitudinal section of the biofilm was studied. The biofilm structure was characterized by a stratified pattern, in which *M. abscessus* growth was mostly restricted to the inner zone of the biofilm, while *P. aeruginosa* grew abundantly in the upper layers. Between both differentiated regions a dark blue zone, in which both species coexisted, was present. Also, some microcolonies of *M. abscessus* could be located in the upper regions of the biofilm. Taking a closer look to the spatial distribution of the community with

CSLM (Fig. 5), it was found that *M. abscessus* within the biofilm was aggregated forming clusters, surrounded by *P. aeruginosa*.

3.6. Proof of concept: biofilm eradication with clarithromycin

Young (24 h) and mature (72 h) single and dual species biofilms of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* were exposed to treatment with clarithromycin for 24 h (Fig. 6.). The results showed a statistically significant decrease in young *M. abscessus* (MAB-DSM) single species biofilms after the treatment (0.39 ± 0.13 , $p \leq 0.05$), compared to its untreated control. Mature *P. aeruginosa* (PA-ATCC) single species biofilms were also significantly affected by the treatment (0.35 ± 0.12 , $p \leq 0.05$). When the log eradication of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* was compared in single vs dual species biofilms, no differences could be found (data not shown).

4. Discussion

Lung infection is the main cause of morbidity and mortality in the CF patient. The increased viscosity of mucus and reduced clearance of potential pathogens predispose patients with CF to infections mediated by biofilms. Nowadays we are aware that these infections are mostly polymicrobial and they influence phenotypic characteristics of individual bacteria, including the response to antibiotic therapy (Lopes et al., 2012; Tavernier et al., 2017; Vandeplassche et al., 2017).

In the present study, a demonstration *in vitro* of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* coexisting in a biofilm was made using a model that mimics *in vivo* biofilm formation (Singla et al., 2014). The increasing initial concentration of *M. abscessus* employed to develop the dual species biofilms had an effect on its population only at 24 and 48 h. Meanwhile, the recovery of *P. aeruginosa* from dual species biofilms was not affected by the different ratios used of *M. abscessus*, except in one case (MAB-3/PA-2) at 24 h. Time elapsed increased the presence of both species in the dual species biofilm, especially between 24 and 48 h. Indeed, the relative species distribution in the community remained stable from 48 to 72 h of biofilm formation in most of the combinations.

In our model, the population of *P. aeruginosa* in dual species biofilms was higher than *M. abscessus* at all the times and ratios examined, probably due to its higher growth rate (Yang et al., 2008). This situation in which the fast-growing organism becomes the dominant species in coexistence with the slower-growing one, which is nevertheless established within the biofilm and continues to increase in numbers over time, has previously been described (Banks and Bryers 1991).

This study also found a significant difference in mycobacterial population in single compared to dual species biofilms after 24 h in all the combinations, suggesting that *P. aeruginosa* has a competitive advantage over *M. abscessus*. The microscopic analysis of the spatial distribution of the species in dual species biofilms showed that both microorganisms were co-aggregated in a layered structure, where *P. aeruginosa* was found in the upper layers and *M. abscessus* in lower layers of the biofilm. This can be explained by the ability of *P. aeruginosa* to spread over the surface by means of organelles-mediated motility, which can outcompete the immobile *M. abscessus* bacteria (Elias and Banin 2012; Moons et al., 2009). This phenomenon, known as “layering” or “blanketing”, has previously been described in a *P. aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* dual species biofilm model (An et al., 2006).

Taking into account these results, we suggest that a 72 h growth of the mixed microbial culture at a ratio 1:1 would be the conditions to produce a mature *M. abscessus*-*P. aeruginosa* dual biofilm, in which all the interactions between the species are established and the relative species distribution is stable.

With that information, young (24 h) and mature (72 h) dual species biofilms were exposed to treatment with clarithromycin, the only oral antibiotic with consistent *in vitro* activity against *M. abscessus* (Jeon et al., 2009; Lee et al., 2015; Nessar et al., 2012). We found that single

species biofilms of both *P. aeruginosa* and *M. abscessus* reference strains reduced significantly its number when exposed to the treatment at 72 h and 24 h of biofilm maturation, respectively. Dual species biofilms were not affected by the treatment, although no significant difference was found when the Log eradication of dual vs single species biofilms was compared, suggesting that *P. aeruginosa* does not influence *M. abscessus* susceptibility to clarithromycin. Until now, *M. abscessus* biofilm susceptibility to antibiotics had only been described in single species biofilms (Flores et al., 2016; Greendyke and Byrd 2008; Ortiz-Perez et al., 2011).

Additionally, a screening of NTM in routine respiratory samples is recommended annually in individuals with a stable clinical course (Floto et al., 2016). Owing to the high rate of mycobacterial culture specimens contaminated with *P. aeruginosa* after the samples are decontaminated using the standard *N*-acetyl L-cysteine (0.5%)-NaOH (2%) method, some authors recommend re-treating the respiratory samples with 5% oxalic acid or with 1% chlorhexidine (Buijtsels and Petit 2005; Ferroni et al., 2006; Oliver et al., 2001). In this study, CNA agar was successfully used as a selective medium for the recovery of *M. abscessus* when growing together with *P. aeruginosa*. With this medium, the recovery of *M. abscessus* was nearly 100% when compared with TSS, and the growth of *P. aeruginosa* was completely inhibited, as it is a gram positive selective media. Thus, further studies with respiratory samples, adding CNA agar after the samples are decontaminated using the standard method, could be performed to determine CNA agar efficacy in culture-based detection of NTM in CF individuals.

5. Conclusion

M. abscessus is an intrinsically antibiotic-resistant NTM that is an emerging pathogen in CF. Although *M. abscessus* might be producing multispecies biofilms in the airways of CF patients, no studies were available in the literature. We developed a simple model with potential applications to test antibiotic susceptibility *in vitro* in biofilms of *M. abscessus* when growing together with a major CF pathogen, *P. aeruginosa*. In the present study, a demonstration *in vitro* of both species co-existing in a dual species biofilm was made, and 72 h growth of the mixed microbial culture at a ratio 1:1 were established as the conditions to produce a mature *M. abscessus* and *P. aeruginosa* dual species biofilm. A significant decrease in mycobacterial population in dual compared to single species biofilms was found, suggesting that *P. aeruginosa* out-competes *M. abscessus*. We also found that *P. aeruginosa* does not influence *M. abscessus* susceptibility to clarithromycin, which indeed showed no efficacy against dual biofilms. Additionally, we indicate that CNA agar might be a suitable media to improve culture-based diagnosis of *M. abscessus* in CF, although further studies are needed in a clinical context.

Acknowledgments

This work was funded by the Ministry of Economy and Competitiveness (Grant MAT2013-48224-C2-2-R). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Part of this work has been reported at the 25th ECCMID (2015, Copenhagen). *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains were kindly provided by the Cystic Fibrosis Unit of La Paz Hospital (Madrid).

References

An, D., et al., 2006. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (10), 3828–3833.

Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (7), 1818–1824.

Banks, M.K., Bryers, J.D., 1991. Bacterial species dominance within a binary culture

biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (7), 1974–1979.

Bedrossian, C.W., et al., 1976. The lung in cystic fibrosis. A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Hum. Pathol.* 7 (2), 195–204.

Bhagirath, A.Y., et al., 2016. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm. Med.* 16 (1), 174.

Binder, A.M., et al., 2013. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infections and associated chronic macrolide use among persons with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188 (7), 807–812.

Buijtsels, P.C., Petit, P.L., 2005. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J. Microbiol. Methods* 62 (1), 83–88.

Burmölle, M., et al., 2010. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59 (3), 324–336.

Burmölle, M., et al., 2014. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol.* 22 (2), 84–91.

Davies, J.C., Alton, E.W., Bush, A., 2007. Cystic fibrosis. *BMJ* 335 (7632), 1255–1259.

DeBel, A., et al., 2013. Sampling and decontamination method for culture of non-tuberculous mycobacteria in respiratory samples of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 51 (12), 4204–4206.

Elias, S., Banin, E., 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (5), 990–1004.

Esther Jr., C.R., et al., 2005. Nontuberculous mycobacterial infection in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 40 (1), 39–44.

Esther Jr., C.R., et al., 2010. Chronic Mycobacterium abscessus infection and lung function decline in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 9 (2), 117–123.

Ferroni, A., et al., 2006. Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 44 (6), 2237–2239.

Flores, V.D., et al., 2016. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. *Microb. Pathog.* 99, 229–235.

Floto, R.A., et al., 2016. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax* 71 (Suppl. 1), i1–i22.

García-Pedrazuela, M., et al., 2015. Polyclonality among clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria: phenotypic and genotypic differences and their potential implications. *Clin. Microbiol. Infect.* 21 (4) 348 e1–348 e4.

Greendyke, R., Byrd, T.F., 2008. Differential antibiotic susceptibility of Mycobacterium abscessus variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (6), 2019–2026.

Griffith, D.E., et al., 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175 (4), 367–416.

Jeon, K., et al., 2009. Antibiotic treatment of Mycobacterium abscessus lung disease: a retrospective analysis of 65 patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (9), 896–902.

Koh, W.J., et al., 2017. Mycobacterial Characteristics and Treatment Outcomes in Mycobacterium abscessus Lung Disease. *Clin. Infect. Dis.* 64 (3), 309–316.

Lee, M.R., et al., 2015. Mycobacterium abscessus complex infections in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 21 (9), 1638–1646.

Levy, I., et al., 2008. Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. *Emerg. Infect. Dis.* 14 (3), 378–384.

Lopes, S.P., et al., 2012. Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40 (3), 260–263.

Melloul, E., et al., 2016. Characteristics of aspergillus fumigatus in association with stentrophomonas maltophilia in an *In vitro* model of mixed biofilm. *PLoS One* 11 (11), e0166325.

Moons, P., Michiels, C.W., Aertsen, A., 2009. 'Bacterial interactions in biofilms'. *Crit. Rev. Microbiol.* 35 (3), 157–168.

Nagano, H., et al., 2017. Causative species of nontuberculous mycobacterial lung disease and comparative investigation on clinical features of Mycobacterium abscessus complex disease: a retrospective analysis for two major hospitals in a subtropical region of Japan. *PLoS One* 12 (10), e0186826.

Nessar, R., et al., 2012. Mycobacterium abscessus: a new antibiotic nightmare. *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (4), 810–818.

Oliver, A., et al., 2001. Nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis.* 32 (9), 1298–1303.

Ortiz-Perez, A., et al., 2011. Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin ciprofloxacin and clarithromycin. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 29 (2), 79–84.

Peters, B.M., et al., 2012. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 25 (1), 193–213.

Prevots, D.R., Marras, T.K., 2015. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin. Chest Med.* 36 (1), 13–34.

Qvist, T., et al., 2015. Chronic pulmonary disease with Mycobacterium abscessus complex is a biofilm infection. *Eur. Respir. J.* 46 (6), 1823–1826.

Qvist, T., et al., 2016. Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 15 (3), 380–385.

Robinson, M., Bye, P.T., 2002. Mucociliary clearance in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 33 (4), 293–306.

Sibley, C.D., Surette, M.G., 2011. The polymicrobial nature of airway infections in cystic fibrosis: cangene Gold Medal Lecture. *Can. J. Microbiol.* 57 (2), 69–77.

Singla, S., Harjai, K., Chhibber, S., 2014. Artificial *Klebsiella pneumoniae* biofilm model

G. Rodríguez-Sevilla et al.

- mimicking in vivo system: altered morphological characteristics and antibiotic resistance. *J. Antibiot. (Tokyo)* 67 (4), 305–309.
- Stout, J.E., Koh, W.J., Yew, W.W., 2016. Update on pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. *Int. J. Infect. Dis.* 45, 123–134.
- Tavernier, S., et al., 2017. Community composition determines activity of antibiotics against multispecies biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (9).
- Vandeplassche, E., Coenye, T., Crabbe, A., 2017. Developing selective media for quantification of multispecies biofilms following antibiotic treatment. *PLoS One* 12 (11), e0187540.

International Journal of Medical Microbiology 308 (2018) 413–423

- Viviani, L., et al., 2016. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) amongst individuals with cystic fibrosis (CF). *J. Cyst. Fibros.* 15 (5), 619–623.
- Waters, V., Ratjen, F., 2016. Antibiotic treatment for nontuberculous mycobacteria lung infection in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 12 CD010004.
- Whittier, S., et al., 1993. Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 31 (4), 861–864.
- Yang, L., et al., 2008. 'In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections'. *J. Bacteriol.* 190 (8), 2767–2776.

Eficacia antibiótica frente a la formación de *biofilms* duales de *Mycobacterium abscessus* y *Pseudomonas aeruginosa* en superficies bióticas y abióticas

Contexto: la infección respiratoria por *M. abscessus* es un grave problema de salud para los pacientes con fibrosis quística debido a su impacto en la función pulmonar y a su resistencia al tratamiento antimicrobiano. Comprender los factores *in vivo* que influyen en el resultado de la terapia puede ayudar a abordar la escasa correlación entre la eficacia antibiótica *in vitro* e *in vivo*. Para ello, se evaluó la influencia del microambiente del huésped en la respuesta de *M. abscessus* a antimicrobianos.

Material y métodos: se formaron *biofilms* monomicrobianos y duales de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* en placas de microtitulación de poliestireno y en un modelo 3-D de células epiteliales pulmonares durante 6h en ausencia y presencia de antibióticos (amikacina, claritromicina, ceftazidima, colistina). Transcurrido el tiempo de incubación, la población de cada bacteria presente en los *biofilms* se cuantificó mediante recuento de colonias en medios específicos.

Resultados: utilizando el modelo más similar a la situación *in vivo* (*biofilms* duales en células epiteliales), se observó que el tratamiento con antibióticos durante el desarrollo del *biofilm* dual inhibió la formación del *biofilm* de *P. aeruginosa*, lo que resultó en una ventaja competitiva para *M. abscessus*, cuya capacidad de formación del *biofilm* permaneció intacta. La eficacia de la claritromicina varió con el modelo usado, siendo inactiva contra *P. aeruginosa* en el modelo celular. Además, se observó un incremento de la formación de *biofilm* de *M. abscessus* en presencia de ciertos antimicrobianos en plástico, pero no en células. La capacidad de formación de *biofilms* de *M. abscessus* en un medio con antimicrobianos se modificó en presencia de *P. aeruginosa*, pero no al revés.

Conclusión: nuestros resultados sugieren que las interacciones, tanto entre especies como con las células epiteliales del huésped, juegan un papel en la sensibilidad bacteriana a los antibióticos, y ponen de relieve la importancia del desarrollo de modelos que permitan la correlación entre los estudios *in vitro* y los resultados *in vivo*. Además, el tratamiento con antimicrobianos del *biofilm* dual ofrece una ventaja competitiva a *M. abscessus* frente a *P. aeruginosa*.



RESEARCH ARTICLE

Influence of three-dimensional lung epithelial cells and interspecies interactions on antibiotic efficacy against *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa*

Graciela Rodríguez-Sevilla¹, Charlotte Rigauts², Eva Vandeplasseche², Lisa Ostyn², Ignacio Mahíllo-Fernández³, Jaime Esteban^{1,*†}, Concepción Pérez-Jorge Peremarch¹, Tom Coenye² and Aurélie Crabbé²

¹Department of Clinical Microbiology, IIS- Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, 28040 Madrid, Spain,

²Laboratory of Pharmaceutical Microbiology, Ghent University, B-9000 Ghent, Belgium and ³Department of Epidemiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, 28040 Madrid, Spain

*Corresponding author: Department of Clinical Microbiology, Fundacion Jimenez Diaz, Av Reyes Catolicos 2, 28040-Madrid (Spain). Tel: +34915504900; E-mail: jestebanmoreno@gmail.com

One sentence summary: The response of *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa* dual-species biofilms to antimicrobial therapy is influenced by host cells and interspecies interactions.

Editor: Thomas Bjarnsholt

†Jaime Esteban, <http://orcid.org/0000-0002-8971-3167>

ABSTRACT

Mycobacterium abscessus lung infection is a major health problem for cystic fibrosis (CF) patients. Understanding the *in vivo* factors that influence the outcome of therapy may help addressing the poor correlation between *in vitro* and *in vivo* antibiotic efficacy. We evaluated the influence of interspecies interactions and lung epithelial cells on antibiotic efficacy. Therefore, single and dual-species biofilms of *M. abscessus* and a major CF pathogen (*Pseudomonas aeruginosa*) were cultured on a plastic surface or on *in vivo*-like three-dimensional (3-D) lung epithelial cells, and the activity of antibiotics (colistin, amikacin, clarithromycin, ceftazidime) in inhibiting biofilm formation was evaluated. Using the most physiologically relevant model (dual-species biofilms on 3-D cells), we observed that treatment with antibiotics during biofilm development inhibited *P. aeruginosa* but not *M. abscessus* biofilms, resulting in a competitive advantage for the latter. Clarithromycin efficacy against *P. aeruginosa* was inhibited by 3-D lung cells. In addition, biofilm induction of *M. abscessus* was observed by certain antibiotics on plastic but not on 3-D cells. *Pseudomonas aeruginosa* influenced the efficacy of certain antibiotics against *M. abscessus*, but not vice versa. In conclusion, these results suggest a role of host cells and interspecies interactions in bacterial responses to antimicrobials.

Keywords: biofilm; *Mycobacterium abscessus*; *Pseudomonas aeruginosa*; cells

INTRODUCTION

Antibiotic tolerance is one of the main features that is making *Mycobacterium abscessus* a global health problem. *Mycobacterium abscessus* is an environmental microorganism, often found in soil and water (Halstrom, Price and Thomson 2015), that can cause lung infection in vulnerable hosts with underlying structural lung disease (Lee et al. 2015), and is increasingly being isolated from respiratory samples of cystic fibrosis (CF) patients. The reported transmissibility of *M. abscessus* between individuals (Bryant et al. 2013, 2016), acquisition of the infection at a young age (Qvist et al. 2014; Park and Olivier 2015; Campos-Herrero et al. 2016) and its impact on lung function decline (Qvist et al. 2016) highlight the importance of studying this microorganism in the CF patient population.

Mycobacterium abscessus lung infection treatment lasts 12 months and includes the use of antibiotics that are selected based on results of *in vitro* susceptibility testing and the toxicity profile of the drug (Flume 2016). A typical regimen against *M. abscessus* includes clarithromycin in combination with amikacin and imipenem, cefoxitin or tigecycline. However, the therapeutic failure and recurrence is high, and drug-related toxicity appears frequently (Martiniano, Nick and Daley 2016; Pasipanodya et al. 2017).

Recently, biofilm formation of *M. abscessus* in the respiratory zone of the lungs of CF patients has been demonstrated (Qvist et al. 2015). Although this biofilm growth mode might be contributing to therapeutic failure, it is well known that *in vivo* biofilms are mostly polymicrobial (Burmolle et al. 2010; Sibley and Surette 2011; Peters et al. 2012; Tay, Chong and Kline 2016) and potential interactions between species sharing the same niche should be considered when evaluating antibiotic therapy (Roder, Sorensen and Burmolle 2016; Tavernier et al. 2017; Vandeplassche, Coenye and Crabbé 2017). Nevertheless, there are few studies focusing on *M. abscessus* interspecies interactions.

One of the pathogens often co-isolated with *M. abscessus* in CF patients is *Pseudomonas aeruginosa* (Levy et al. 2008; Binder et al. 2013; Viviani et al. 2016). A recent study by Birmes et al. (2017) showed that, when co-cultured, some strains of *M. abscessus* are able to degrade *P. aeruginosa* quorum-sensing molecules HHQ (2-heptyl-4(1H)-quinolone) and PQS (*Pseudomonas* quinolone signal), suggesting a competitive advantage of *M. abscessus* against *P. aeruginosa*. Indeed, antimicrobial therapy in CF seems to be a risk factor for pulmonary infection by *M. abscessus* (Catherinot et al. 2013), given its intrinsic resistance to conventional antimicrobials.

In order to take into account host-pathogen interactions and to provide more reliable and predictive information about the infection process, *in vitro* three-dimensional (3-D) cell culture models have been developed. Three-dimensional cell culture models of lung tissue, derived from alveolar epithelial cells (A549 cell line), show expression of specific epithelial cell markers indicative of barrier function, polarity and multicellular complexity, thus reflecting key aspects of the *in vivo* parental tissue (Carterson et al. 2005; Barrila et al. 2010; Crabbé, Ledesma and Nickerson 2014; Crabbé et al. 2017). Recently, *P. aeruginosa* was demonstrated to form antibiotic-resistant biofilms on 3-D lung epithelial cells without affecting host cell viability and differentiation (Crabbé et al. 2017).

The poor correlation between *in vitro* and *in vivo* makes it important to understand the *in vivo* factors that may influence the outcome of the therapy. For that purpose, mimicking both the *in vivo* bacterial phenotype and the host microenvironment can improve the correlation between *in vitro* and *in vivo* antibi-

otic efficacy. Our objective is to evaluate the effect of antibiotics commonly used to treat respiratory infection in CF in *M. abscessus* biofilm formation in the presence of (i) another major CF pathogen frequently co-isolated with *M. abscessus* (i.e. *P. aeruginosa*) and (ii) *in vivo*-like 3-D lung epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

Clinical strains isolated from sputum samples of different patients with chronic pulmonary disease were used: *P. aeruginosa* strain was isolated from a CF patient and presented a mucoid phenotype, while *M. abscessus* subsp. *massiliense* was isolated from a patient with bronchiectasis and showed a smooth colony phenotype. According to ATS/IDSA criteria (Griffith et al. 2007), *M. abscessus* isolate had clinical significance. Minimal inhibitory concentration (MIC) values ($\mu\text{g/mL}$) of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* are shown in Table S1 (Supporting Information).

Both *P. aeruginosa* and *M. abscessus* were cultured from a -80°C glycerol stock on Luria-Bertani agar (LB). Bacterial suspensions were made from the agar plates in BHI broth and cultured aerobically at 37°C under constant shaking conditions (250 rpm). *Pseudomonas aeruginosa* cultures were grown for 24 h, while *M. abscessus* cultures were grown for 48 h until stationary phase.

For the inhibition studies, the cultures were centrifuged (5 min, $4500 \times g$), resuspended in host cell culture media (GTSF-2) and then diluted to an optical density ($\lambda = 595 \text{ nm}$) of 0.05 in the case of *P. aeruginosa*, and 0.2 in the case of *M. abscessus*, both corresponding to $\sim 5 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$.

Antimicrobial agents

For the inhibition studies, four antibiotics were chosen based on their use to treat pulmonary infections in CF patients by (i) *P. aeruginosa* (colistin and ceftazidime), (ii) both *P. aeruginosa* and *M. abscessus* (amikacin), or (iii) *M. abscessus* (clarithromycin). All antibiotics were purchased from Sigma-Aldrich or TCI. Antibiotic stocks were made, according to the solubility of each antibiotic, in MQ water for amikacin (50 mg/mL) and colistin (50 mg/mL), in MQ water supplemented with anhydrous sodium carbonate for ceftazidime (11 mg/mL) and in DMSO for clarithromycin (1.1 mg/mL).

Inhibition of bacterial association with an abiotic surface

The inhibition of biofilm formation on a plastic surface was carried out as published previously (Crabbé et al. 2017) with minor modifications. The antibiotics used were amikacin (17 $\mu\text{g/mL}$), clarithromycin (1.1 $\mu\text{g/mL}$), colistin (2 $\mu\text{g/mL}$) and ceftazidime (256 $\mu\text{g/mL}$) diluted in the host cell culture medium, i.e. GTSF-2 medium supplemented with 2.5 mg/L ITS, 1.5 g/L sodium bicarbonate, and 10% FBS (Invitrogen). Following addition of the antibiotics, *P. aeruginosa* and *M. abscessus* were added to the solutions at a final concentration of $2.5 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$ each (proportion 1:1). Single-species biofilm controls of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* were included for each condition. Biofilms were formed on the surface of flat-bottomed 96-well microtiter plates (MTP) by adding 100 μL /well of the bacterial suspension, supplemented or not with antibiotics. MTPs were incubated statically for 6 h at 37°C . Antibiotic concentrations were determined empirically to obtain inhibition of 1 to 2 log units of

at least one species, while maintaining dual-species biofilms post-treatment on a plastic surface. This allowed us to observe differences in antibiotic efficacy against single- versus dual-species biofilm formation and to compare association with plastic or with the 3-D lung epithelial cell model. After 6 h, the culture media was removed and biofilms were rinsed twice with sterile saline solution (SS) to remove non-adherent cells, filled again with SS, vortexed, sonicated and serially diluted. Viable counts of each bacteria were determined by drop plating serially diluted samples onto two selective media (MacConkey Agar and Columbia Colistin Nalidixic Acid Agar with 5% Sheep Blood). *Pseudomonas aeruginosa* colonies on MacConkey agar were counted after 24 h of incubation, whereas *M. abscessus* colonies on CNA agar were counted after 72 h.

Inhibition of bacterial association with 3-D human lung epithelial cells

Three-dimensional lung models were derived from the human epithelial cell line A549 and cultured in GTSE-2 supplemented with 2.5 mg/L ITS, 1.5 g/L sodium bicarbonate and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen) as described previously (Carterson et al. 2005; Crabbé et al. 2011). On the day of infection, the 3-D aggregates were removed from the RWV bioreactor and placed into 48-well plates (2.5×10^5 cells/well). In each well, antibiotics and bacteria were added to reach the same concentration as in the inhibition study on a plastic surface (final volume of 250 μ L/well), being the multiplicity of infection in the multispecies cultures 50:1, and in the monospecies cultures 25:1. The plate was incubated statically for 6 h in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

After the incubation, the number of bacteria infecting the cells was quantified as published previously (Anderson et al. 2008; Tran et al. 2014; Crabbé et al. 2017). Briefly, the 3-D aggregates were transferred in a new 48-well plate and washed two times with Hank's Balanced Salt Solution to remove non-adherent bacteria. The adhered and intracellular bacteria were quantified after lysing the cells with 1% Triton-X and plating serial dilutions of the lysates on selective media (MacConkey Agar and Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood).

Evaluation of 3-D aggregate morphology and cell viability

To assess overall morphology and integrity of the 3-D cell aggregates, light microscopic imaging was performed at a magnification of $\times 300$ with an EVOS FL Auto Imaging System (Life Technologies). Thereafter, epithelial cells were detached from the microcarrier bead scaffolds using 0.25% Trypsin-EDTA and stained with fluorochrome-labeled Annexin V and propidium iodide (Thermo Fisher Scientific®) for quantification of apoptotic and necrotic cells using an Attune flow cytometer (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

All the experiments were performed at least in biological triplicate, except for cell viability that was performed in biological duplicate. The technical and the biological variability between replicates were below 25% in all the experiments. The normal distribution of the data was assessed using the Shapiro-Wilk test. The means of the log CFU/mL for each experiment were compared with an ANOVA test when the number of conditions

was more than two. If the comparison was made between two conditions, then an independent-sample t-test was performed. Statistical significance was considered when P-value was less than or equal to 0.05.

RESULTS

Mycobacterium abscessus and *P. aeruginosa* develop dual-species communities on plastic and 3-D lung epithelial cells

After 6 h of infection, *M. abscessus* and *P. aeruginosa* were recovered in similar absolute abundances in the dual-species biofilm both on a plastic surface (Fig. 1A) and on 3-D lung epithelial cells (Fig. 1B). The bacterial density of each species in the dual-species biofilm on plastic was not different from the density in single-species biofilms. However, in the presence of 3-D lung epithelial cells, a decrease in *M. abscessus* biofilm formation was observed in dual- compared to single-species biofilms ($P < 0.05$).

The integrity of the 3-D cell aggregates and epithelial cell viability was not affected by the presence of single- or dual-species biofilms, with epithelial cell viability in all conditions being higher than 85% (Fig. S1, Supporting Information).

Antibiotic efficacy against *M. abscessus* and *P. aeruginosa* single- and dual-species biofilms

During this study, antibiotic efficacy was evaluated in four model systems with increasing complexity: (i) single-species biofilms of *P. aeruginosa* or *M. abscessus* on a plastic surface, (ii) dual-species biofilms of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* on a plastic surface, (iii) single-species biofilms of *P. aeruginosa* or *M. abscessus* on 3-D lung epithelial cells, (iv) dual-species biofilms of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* on 3-D lung epithelial cells.

Antibiotic efficacy in preventing biofilm formation on plastic was tested on single- and dual-species cultures of *P. aeruginosa* and *M. abscessus*, and the results are shown in Fig. 1A. *Pseudomonas aeruginosa* grown as single- and dual-species biofilms was inhibited by all tested antibiotics ($P \leq 0.01$). For *M. abscessus*, a significant increase in the biofilm formation was observed when the single-species biofilms were treated either with clarithromycin ($36.67 \times \text{MIC}$, $0.37 \pm 0.12 \log$, $P = 0.025$), colistin ($0.43 \pm 0.12 \log$, $P = 0.008$) or amikacin ($8.5 \times \text{MIC}$, $0.58 \pm 0.13 \log$, $P = 0.001$). In the dual-species biofilm on a plastic surface, there was an increase in the bacterial density of *M. abscessus* when the biofilm was treated with amikacin ($0.47 \pm 0.12 \log$, $P = 0.004$) or clarithromycin ($0.37 \pm 0.11 \log$, $P = 0.013$).

The results of the antibiotic efficacy in preventing association with 3-D lung epithelial cells are shown in Fig. 1B. All antibiotics resulted in a statistically significant decrease in association with the 3-D cells for *P. aeruginosa* single- and dual-species cultures ($P < 0.01$), except for clarithromycin which was ineffective ($P > 0.05$). For *M. abscessus*, association with the 3-D lung epithelial cells in single- and dual-species cultures was not inhibited by antibiotic treatment. As opposed to the results on plastic, no biofilm induction of *M. abscessus* was observed in the presence of antibiotics.

Influence of interspecies interactions on antibiotic efficacy

The results of the comparison of single versus dual biofilm inhibition with antibiotics are shown in Fig. 2. When *M. abscessus* was grown in a dual-species biofilm with *P. aeruginosa* on a

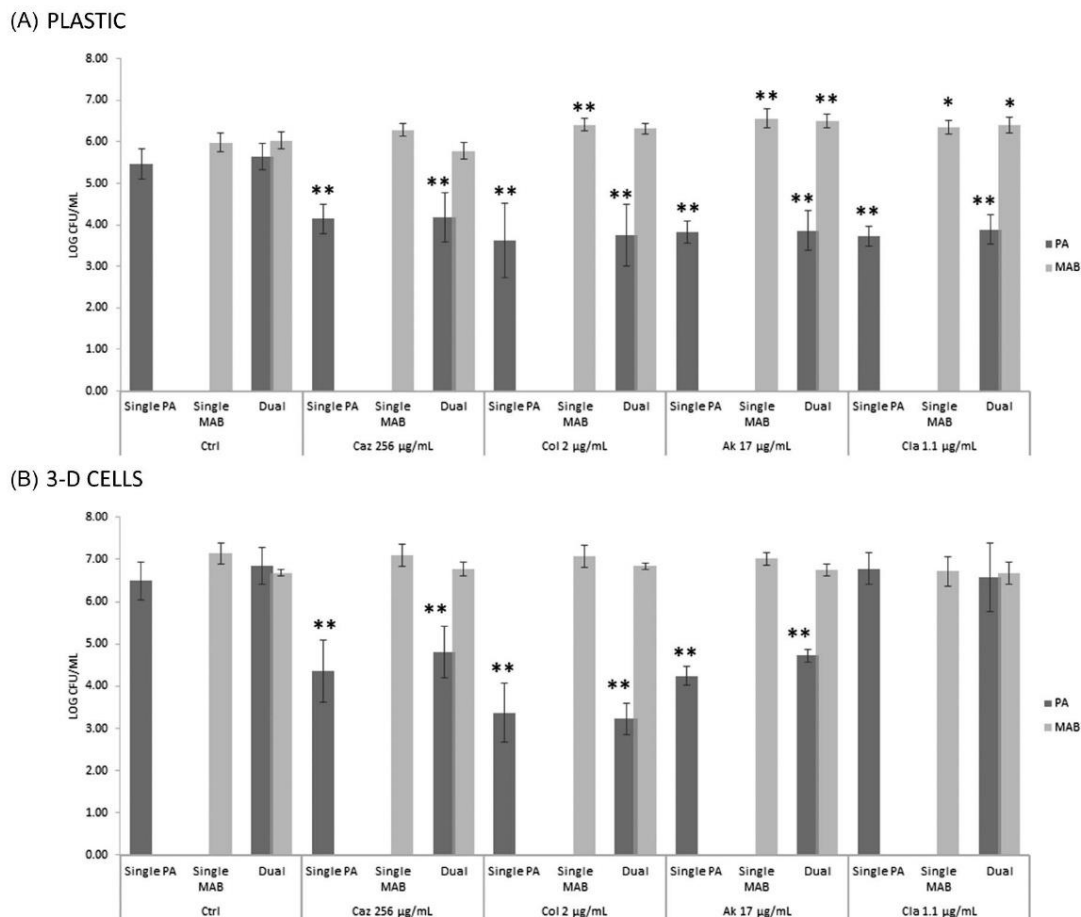


Figure 1. Inhibition of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* single- and dual-species biofilm formation on a plastic surface or on 3-D lung epithelial cells. Inhibition of biofilm formation was assessed based on the number of bacteria associated with the plastic surface (A) or with the 3-D lung epithelial cells (B) in single and dual cultures of *P. aeruginosa* (PA) and *M. abscessus* (MAB) in the presence or absence of antibiotics. Ak = amikacin, Cla = clarithromycin, Caz = ceftazidime, Col = colistin. * $P < 0.05$ when comparing a treated organism to its control without antibiotic, ** $P < 0.01$ when comparing a treated organism to its control without antibiotic. (Data shown are average; $n \geq 3$; error bars indicate SD.)

plastic surface, ceftazidime inhibited biofilm formation more effectively ($P < 0.01$) as compared to the single-species biofilms of *M. abscessus*, whose formation was induced when treated with this antibiotic.

On the 3-D epithelial cell model, our data showed an overall trend of decreased efficacy of antibiotics against *M. abscessus* when grown together with *P. aeruginosa*, with colistin reaching statistical significance ($P < 0.01$).

For *P. aeruginosa*, no significant differences were observed in antibiotic efficacy with or without *M. abscessus* for any of the tested antibiotics, both on abiotic and biotic surfaces.

Influence of 3-D lung epithelial cells on antibiotic efficacy

The biofilm inhibition on plastic or 3-D lung epithelial cells was compared (Fig. 3).

For *P. aeruginosa*, an overall trend was observed for a more effective biofilm inhibition both for single- and dual-species biofilms in the 3-D lung epithelial model. Statistical significant differences between models were found when the single-species biofilm of *P. aeruginosa* was treated with ceftazidime ($P < 0.05$)

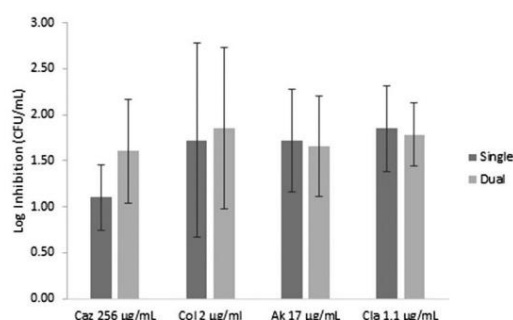
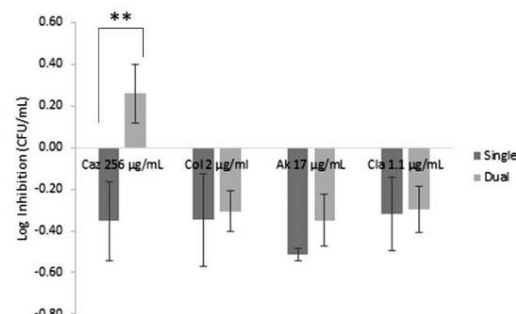
and the dual-species biofilm with colistin ($P < 0.01$). With clarithromycin, the opposite effect was found: clarithromycin inhibited more effectively the development of single ($P < 0.01$) and dual ($P < 0.05$) biofilms of *P. aeruginosa* on a plastic surface as compared to 3-D lung epithelial cells.

Regarding *M. abscessus* single-species biofilms, a more effective biofilm inhibition was observed in the 3-D lung epithelial model compared to plastic with all of the antibiotics ($P < 0.01$) since induction of biofilm formation by antibiotics was not observed in the presence of 3-D cells. *M. abscessus* biofilm induction in dual-species biofilms was, in general, less pronounced in the 3-D lung epithelial model as compared to a plastic surface, with amikacin reaching statistical significance ($P < 0.05$). In contrast, ceftazidime treatment of dual-species biofilms inhibited *M. abscessus* biofilm formation in the plastic model, compared to the 3-D lung epithelial cells ($P < 0.05$).

DISCUSSION

The poor correlation between *in vitro* susceptibility testing results and *in vivo* outcomes makes it necessary to develop models that are able to predict the success or failure of a treatment.

(A) PLASTIC

P. aeruginosa*M. abscessus*

(B) 3-D CELLS

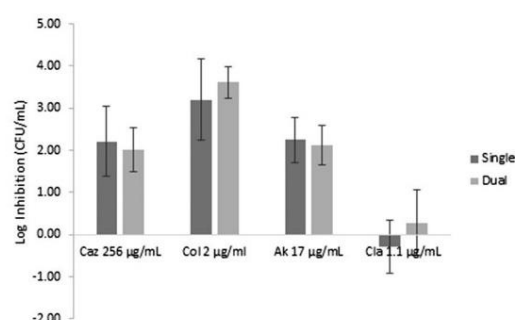
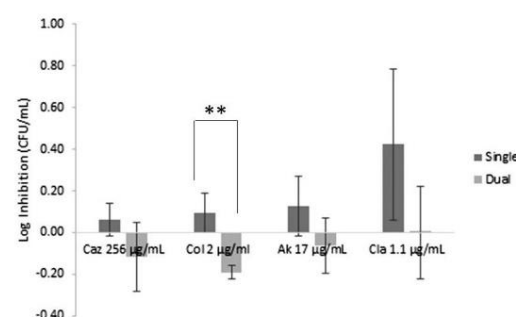
P. aeruginosa*M. abscessus*

Figure 2. Influence of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* interspecies interactions on antibiotic efficacy. Comparison of the Log inhibition (CFU/mL) per antibiotic in single- versus dual-species biofilms of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* on plastic (A) or on a 3-D lung epithelial cell model (B). Ak = amikacin, Cla = clarithromycin, Caz = ceftazidime, Col = colistin. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$. (Data shown are average; $n \geq 3$; error bars indicate SD.)

For that purpose, mimicking the *in vivo* phenotype of the bacteria, the host and its microenvironment may help us understand the underlying causes for the discrepancies between *in vitro* and *in vivo* antibiotic efficacy. Indeed, it is well known that bacteria grow as biofilms in CF and are polymicrobial in nature (Quinn et al. 2016; Roder, Sorensen and Burmolle 2016; Vandeplassche, Coenye and Crabbé 2017). Interactions between species sharing the same niche can have synergistic or antagonistic effects in the response to antibiotics; thus, the community has to be considered when evaluating antibiotic treatment (Beaudoin et al. 2017; Lopes, Azevedo and Pereira 2017; Tavernier et al. 2017). Furthermore, host epithelial cells have been shown to influence the antibiotic efficacy of several microorganisms, including *P. aeruginosa* (Anderson et al. 2008; Crabbé et al. 2017).

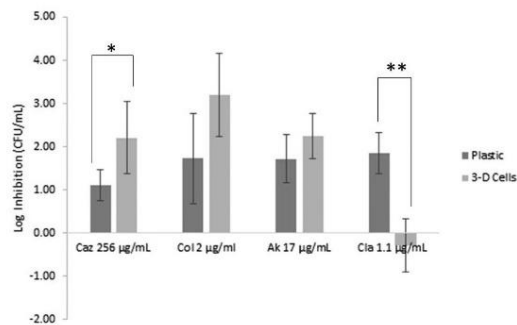
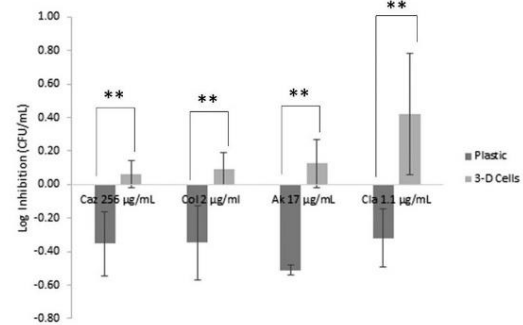
In order to mimic aspects of the *in vivo* situation, we incorporated interactions of *M. abscessus* with the commonly co-isolated bacteria *P. aeruginosa* and physiologically relevant 3-D lung epithelial cells when evaluating the efficacy of antibiotics commonly employed in the treatment of CF.

It was observed that *M. abscessus* was capable of developing dual-species communities with *P. aeruginosa* on different surfaces (plastic and 3-D lung epithelial cells) and that both species were present in similar absolute abundances, although

P. aeruginosa is a fast-growing bacteria (LaBauve and Wargo 2012) and *M. abscessus* rate of growth is lower (Brown-Elliott and Wallace 2015).

Our results showed that *M. abscessus* response to antibiotics was influenced by the presence of *P. aeruginosa*, but not vice versa. In particular, *P. aeruginosa* prevented induction of *M. abscessus* biofilm formation following treatment with ceftazidime on plastic. Meanwhile, in the 3-D lung epithelial model *P. aeruginosa* improved *M. abscessus* association with the 3-D cells after treatment with colistin. We also observed that 3-D lung epithelial cells influence the antibiotic efficacy against both *P. aeruginosa* and *M. abscessus*. Notably, the efficacy of clarithromycin against *P. aeruginosa* was strongly inhibited by 3-D lung cells. A possible explanation is that macrolides such as clarithromycin accumulate intracellularly, as opposed to most other antibiotic classes (Carryn et al. 2003). This could result in a lower bioavailability of clarithromycin in the presence of 3-D lung epithelial cells. Our results also indicated that the antibiotics commonly employed to treat chronic infection (colistin) or exacerbations (ceftazidime) caused by *P. aeruginosa* were more effective in inhibiting dual- and single- species biofilm formation in the 3-D cell model compared to on plastic. Differences in antibiotic efficacy against single-species *P. aeruginosa* biofilm formation were

(A) SINGLE BIOFILMS

P. aeruginosa*M. abscessus*

(B) DUAL BIOFILMS

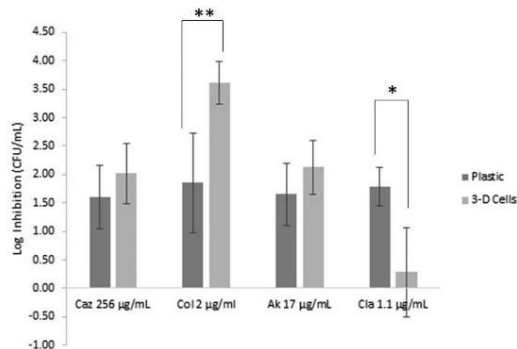
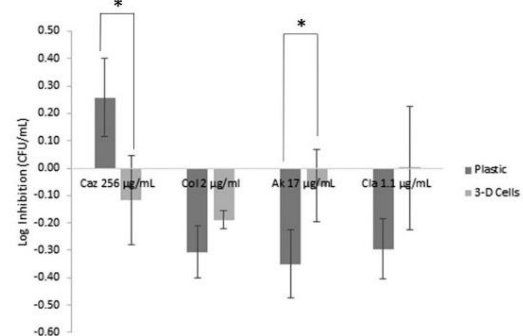
P. aeruginosa*M. abscessus*

Figure 3. Influence of the model system used on antibiotic efficacy against *P. aeruginosa* and *M. abscessus* single- and dual-species biofilm formation. Comparison of the Log inhibition (CFU/mL) per antibiotic in *P. aeruginosa* and *M. abscessus* single- (A) and dual-species (B) biofilm formation on plastic versus on 3-D lung epithelial cells. Ak = amikacin, Cla = clarithromycin, Caz = ceftazidime, Col = colistin. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$. (Data shown are average; $n \geq 3$; error bars indicate SD)

observed when grown on plastic versus 3-D lung epithelial cells, depending on the antibiotic being used (Crabbé et al. 2017). However, ceftazidime efficacy against *P. aeruginosa* biofilm formation was previously described not to be influenced by 3-D lung epithelial cells (Crabbé et al. 2017); yet this was tested on the laboratory strain PAO1 indicating presumable strain-dependent effects. Enhanced antibiotic efficacy in the presence of epithelial cells can be due to synergistic effects between antibiotics and epithelial endogenously produced antimicrobial peptides, such as β -defensins (Bals 2000; Schutte and McCray 2002; Sim et al. 2009). Another main difference between both model systems is that we observed *M. abscessus* biofilm induction by antibiotics on a plastic surface but not on the 3-D lung epithelial cells. Biofilm formation can be induced by sub-MIC concentrations of antibiotics (Kaplan 2011) and, although expected from antibiotics with no effect against *M. abscessus*, such as colistin and ceftazidime, it was surprising to obtain this result with amikacin and clarithromycin, both active *in vitro* against *M. abscessus*, and added to the inhibition assay at 8.5 and 36.67 times the MIC, respectively.

When focusing on our most physiologically relevant model (i.e. dual-species biofilms on 3-D lung cells), it was observed that treatment with antibiotics in the early stages of biofilm formation could inhibit *P. aeruginosa* biofilm growth mode, with the ex-

ception of clarithromycin, while no effective inhibition was seen in the case of *M. abscessus*. This resulted in a competitive advantage for *M. abscessus* in dual-species biofilms for all tested antibiotics, except again for clarithromycin. Thus, antibiotic therapy in CF typically targeting *P. aeruginosa* in the initial stages of biofilm formation could lead to a competitive advantage in lung epithelial colonization to *M. abscessus* over *P. aeruginosa*.

In conclusion, our study demonstrated that inhibition of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* biofilm formation is influenced by host epithelial cells and interspecies interactions. Our results highlight the importance of understanding the role that *in vivo* host and bacterial factors play in the efficacy of antibiotics. Hence, this knowledge could lead to the development of models that enable stronger correlation between *in vitro* studies and *in vivo* outcomes. We also found a competitive advantage for *M. abscessus* in dual-species biofilms for several tested antibiotics suggesting that therapy targeting *P. aeruginosa* in the early stages of biofilm formation may favor *M. abscessus* epithelial lung colonization.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at FEMSPD online.

ACKNOWLEDGEMENT

We are grateful to Mrs Inne D'Hondt and Mrs Petra Rigole (Ghent University) for excellent technical support.

FUNDING

This work was funded by an Odysseus grant of the Research Foundation Flanders (AC) and by a research grant of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) (AC). GRS received a scholarship from the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

- Anderson GG, Moreau-Marquis S, Stanton BA et al. In vitro analysis of tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived airway epithelial cells. *Infect Immun* 2008;**76**:1423–33.
- Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 2000;**1**:141–50.
- Brown-Elliott BA, Wallace RJ. *Mycobacterium: Clinical and Laboratory Characteristics of Rapidly Growing Mycobacteria*, 11th edn, Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press, 2015, 13.
- Barrila J, Radtke AL, Crabbé A et al. Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol* 2010;**8**:791–801.
- Beaudoin T, Yau YCW, Stapleton PJ et al. *Staphylococcus aureus* interaction with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm enhances tobramycin resistance. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017;**3**:25.
- Binder AM, Adjemian J, Olivier KN et al. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infections and associated chronic macrolide use among persons with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;**188**:807–12.
- Birmes FS, Wolf T, Kohl TA et al. *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* is capable of degrading *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signals. *Front Microbiol* 2017;**8**:339.
- Bryant JM, Grogono DM, Greaves D et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 2013;**381**:1551–60.
- Bryant JM, Grogono DM, Rodríguez-Rincon D et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science* 2016;**354**:751–57.
- Burmölle M, Thomsen TR, Fazli M et al. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;**59**:324–36.
- Campos-Herrero MI, Chamizo FJ, Caminero JA et al. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis patients on the Island of Gran Canaria. A population study. *J Infect Chemother* 2016;**22**:526–31.
- Carrin S, Chanteux H, Seral C et al. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. *Infect Dis Clin N Am* 2003;**17**:615–34.
- Carterson AJ, Höner zu Bentrop K, Ott CM et al. A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: alternative tissue culture model for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* 2005;**73**:1129–40.
- Catherinot E, Roux AL, Vibet MA et al. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* complex target distinct cystic fibrosis patient subpopulations. *J Cyst Fibros* 2013;**12**:74–80.
- Crabbé A, Ledesma MA, Nickerson CA. Mimicking the host and its microenvironment in vitro for studying mucosal infections by *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog Dis* 2014;**71**:1–19.
- Crabbé A, Liu Y, Matthijs N et al. Antimicrobial efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in a three-dimensional lung epithelial model and the influence of fetal bovine serum. *Sci Rep* 2017;**7**:43321.
- Crabbé A, Sarker SF, Van Houdt R et al. Alveolar epithelium protects macrophages from quorum sensing-induced cytotoxicity in a three-dimensional co-culture model. *Cell Microbiol* 2011;**13**:469–81.
- Flume PA. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2016;**15**:139–40.
- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;**175**:367–416.
- Halstrom S, Price P, Thomson R. Review: environmental mycobacteria as a cause of human infection. *Int J Mycobacteriol* 2015;**4**:81–91.
- Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs* 2011;**34**:737–51.
- LaBauve AE, Wargo MJ. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protoc Microbiol* 2012. Chapter 6:Unit 6E.1. DOI: 10.1002/9780471729259.mc06e01s25.
- Lee MR, Sheng W-H, Hung C-C et al. *Mycobacterium abscessus* complex infections in humans. *Emerg Infect Dis* 2015;**21**:1638–46.
- Levy I, Grisaru-Soen G, Lerner-Geva L et al. Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. *Emerg Infect Dis* 2008;**14**:378–84.
- Lopes SP, Azevedo NF, Pereira MO. Developing a model for cystic fibrosis sociomicrobiology based on antibiotic and environmental stress. *Int J Med Microbiol* 2017;**307**:460–70.
- Martiniano SL, Nick JA, Daley CL. Nontuberculous mycobacterial infections in cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 2016;**37**:83–96.
- Park IK, Olivier KN. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Semin Respir Crit Care Med* 2015;**36**:217–24.
- Pasipanodya JG, Ogbonna D, Ferro BE et al. Systematic review and meta-analyses of the effect of chemotherapy on pulmonary *Mycobacterium abscessus* outcomes and disease recurrence. *Antimicrob Agents Ch* 2017;**61**: e01206-17.
- Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA et al. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev* 2012;**25**:193–213.
- Quinn RA, Whiteson K, Lim YW et al. Ecological networking of cystic fibrosis lung infections. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2016;**2**:4.
- Qvist T, Eickhardt S, Kragh KN et al. Chronic pulmonary disease with *Mycobacterium abscessus* complex is a biofilm infection. *Eur Respir J* 2015;**46**:1823–6.
- Qvist T, Pressler T, Høiby N et al. Shifting paradigms of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Respir Res* 2014;**15**:41.

- Qvist T, Taylor-Robinson D, Waldmann E et al. Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2016;**15**:380–5.
- Roder HL, Sorensen SJ, Burmolle M. Studying bacterial multispecies biofilms: where to start?. *Trends Microbiol* 2016;**24**:503–13.
- Schutte BC, McCray PB, Jr. [beta]-defensins in lung host defense. *Annu Rev Physiol* 2002;**64**:709–48.
- Sibley CD, Surette MG. The polymicrobial nature of airway infections in cystic fibrosis: Cangene Gold Medal Lecture. *Can J Microbiol* 2011;**57**:69–77.
- Sim SH, Liu Y, Wang D et al. Innate immune responses of pulmonary epithelial cells to *Burkholderia pseudomallei* infection. *PLoS One* 2009;**4**:e7308.
- Tavernier S, Crabbé A, Hacıoglu M et al. Community composition determines activity of antibiotics against multispecies biofilms. *Antimicrob Agents Ch* 2017;**61**:e00302–17.
- Tay WH, Chong KK, Kline KA. Polymicrobial-host interactions during infection. *J Mol Biol* 2016;**428**:3355–71.
- Tran CS, Rangel SM, Almblad H et al. The *Pseudomonas aeruginosa* type III translocon is required for biofilm formation at the epithelial barrier. *PLoS Pathog* 2014;**10**:e1004479.
- Vandeplassche E, Coenye T, Crabbé A. Developing selective media for quantification of multispecies biofilms following antibiotic treatment. *PLoS One* 2017;**12**:e0187540.
- Viviani L, Harrison MJ, Zolin A et al. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) amongst individuals with cystic fibrosis (CF). *J Cyst Fibros* 2016;**15**:619–23.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Antibiotic	MIC (µg/mL)	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. abscessus</i>
Colistin	≤0.5 (S)	>128
Amikacin	8 (S)	2 (S)
Ceftazidime	4 (S)	>128
Clarithromycin	>128	≤0.03 (S)
Cefoxitin	ND	32 (I)
Ciprofloxacin	ND	2 (S)
Doxycyclin	ND	32 (R)
Linezolid	ND	8 (S)

Table S1. Minimal Inhibitory Concentration data overview. The MIC values (µg/mL) for *P. aeruginosa* and *M. abscessus* were determined following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Interpretation of the MIC (if applicable) is shown after the MIC values in brackets: S: susceptible; I: intermediate; R: resistant. ND: Not determined.

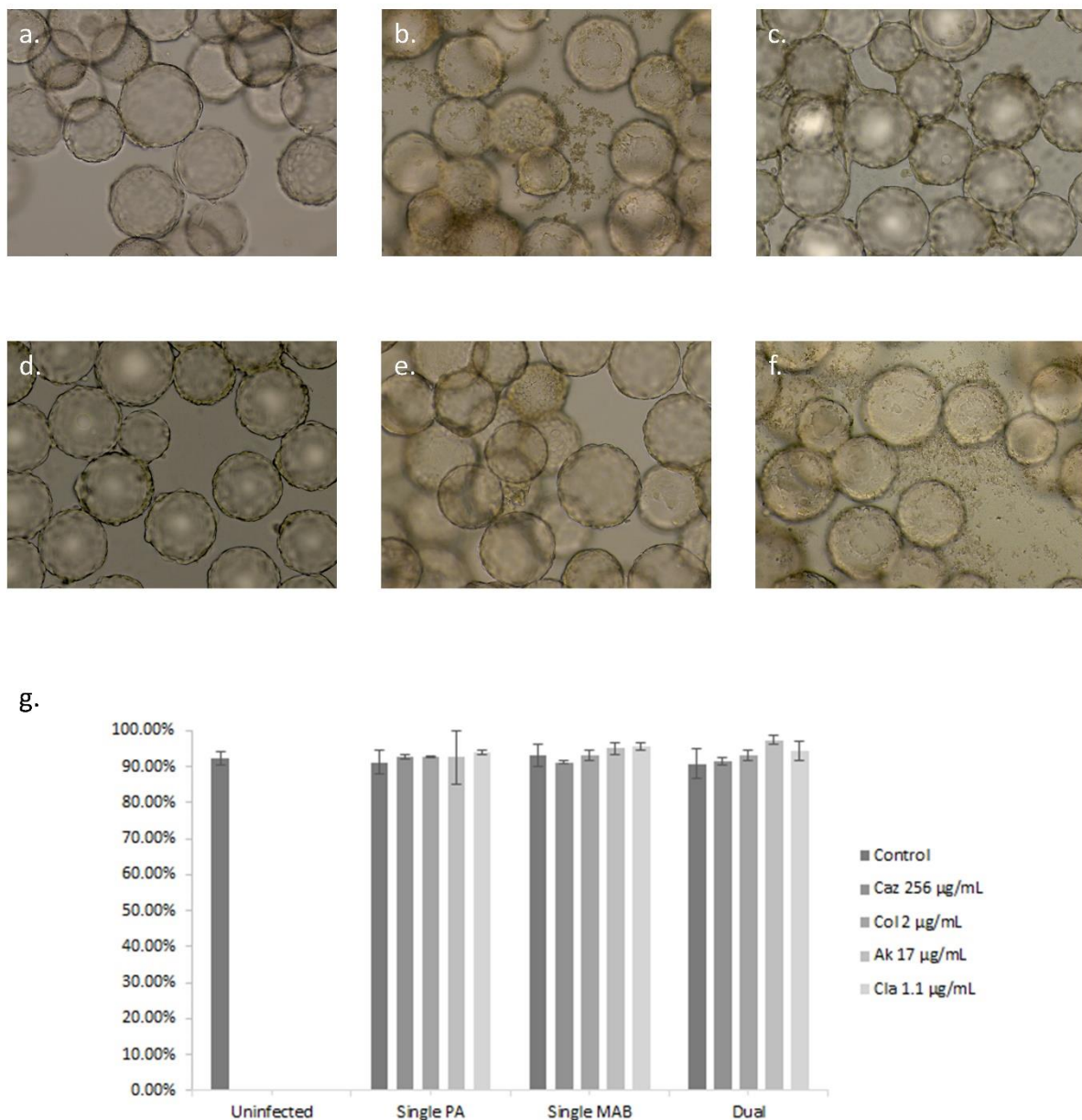


Figure S1. 3-D lung epithelial model integrity and cell viability following infection with *P. aeruginosa* and *M. abscessus* single and dual cultures. 3-D aggregate morphology was evaluated using light microscopy imaging at a 300x magnification (Images a-f: a: uninfected, b: dual species *biofilm*, no treatment, c: dual species *biofilm*, treatment with ceftazidime, d: dual species *biofilm*, treatment with amikacin, e: dual species *biofilm*, treatment with colistin, f: dual species *biofilm*, treatment with clarithromycin). The percentage of viable cells (g) was determined using an Annexin V-PI kit in combination with flow cytometry. (Data shown are average; n=2; error bars indicate SD)

Efecto del tratamiento antipseudomónico en *biofilms* duales de *Mycobacterium abscessus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Contexto: *M. abscessus* es un patógeno emergente en FQ. Los factores fisiológicos que contribuyen al establecimiento de la infección pulmonar por *M. abscessus* siguen sin esclarecerse. El uso de antibióticos en FQ, a los que *M. abscessus* es intrínsecamente resistente, podría erradicar determinadas bacterias que en condiciones normales causarían una exclusión de este patógeno. Por ello, determinamos si el uso de antimicrobianos dirigidos a un patógeno clásico en FQ (*i.e.*, *P. aeruginosa*) podría suponer una ventaja competitiva para *M. abscessus* cuando ambas especies están presentes en un *biofilm* dual. Además, estudiamos si las interacciones entre microorganismos modifican la sensibilidad a antimicrobianos.

Material y métodos: se formaron *biofilms* duales y monomicrobianos en membranas de policarbonato con cepas clínicas y de colección de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* y se incubaron durante 24 o 72h. Después, se transfirieron a placas de Antibiotic Medium 2 suplementadas con antimicrobianos empleados habitualmente en el tratamiento de la exacerbación (amikacina, ceftazidima) y de la infección crónica por *P. aeruginosa* (colistina). Tras 24h de tratamiento, ambas bacterias se cuantificaron por recuento en medios específicos.

Resultados: *M. abscessus* mostró una mayor tolerancia a amikacina, tratamiento de primera línea de la enfermedad pulmonar por *M. abscessus*, cuando forma *biofilms* duales con *P. aeruginosa*. En ausencia de tratamiento *P. aeruginosa* inhibió la formación de *biofilm* de *M. abscessus*, sin embargo, el tratamiento dirigido a *P. aeruginosa* disminuyó esta interacción competitiva, incrementando la supervivencia de *M. abscessus*.

Conclusiones: estos resultados sugieren que la terapia antibiótica dirigida a un patógeno específico puede resultar en la proliferación de los microorganismos que muestren resistencia a esos mismos antibióticos. Asimismo, nuestros datos apoyan la necesidad de considerar las interacciones que se producen entre especies coinfectantes cuando se evalúa la eficacia antibiótica.

AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGYAntimicrobial Agents
and Chemotherapy®

EXPERIMENTAL THERAPEUTICS



Antimicrobial Treatment Provides a Competitive Advantage to *Mycobacterium abscessus* in a Dual-Species Biofilm with *Pseudomonas aeruginosa*

Graciela Rodríguez-Sevilla,^a Aurélie Crabbé,^b Marta García-Coca,^a John Jairo Aguilera-Correa,^a Jaime Esteban,^a Concepción Pérez-Jorge^a

^aDepartment of Clinical Microbiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^bLaboratory of Pharmaceutical Microbiology, Department of Pharmaceutical Analysis, Ghent University, Ghent, Belgium

ABSTRACT The physiological factors that contribute to *Mycobacterium abscessus* lung infections remain unclear. We determined whether antibiotic treatment targeting a major cystic fibrosis pathogen (i.e., *Pseudomonas aeruginosa*) could provide the ideal conditions for the establishment of *M. abscessus* infection. Our data showed that *P. aeruginosa* inhibited *M. abscessus* biofilm formation under control conditions and that antimicrobial therapy selectively targeting *P. aeruginosa* diminished this competitive interaction, thereby increasing *M. abscessus* survival.

KEYWORDS *Mycobacterium abscessus*, *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial, biofilms, treatment

Chronic lung infection is the main cause of morbidity and death among cystic fibrosis (CF) patients. *Pseudomonas aeruginosa* is the most prevalent species causing acute and chronic respiratory infections in CF (1). However, the CF lung microbiota also includes other microorganisms, such as nontuberculous mycobacteria (NTM), which are mainly acquired from environmental reservoirs (1–3).

Mycobacterium abscessus is an emergent pathogen causing biofilm-related pulmonary infections in patients with preexisting lung disease, with prevalence rates of 6 to 13% among CF patients (4–9). Since no regimen has been demonstrated to be systematically successful against *M. abscessus* infections (10, 11), therapeutic guidelines recommend treating conventional bacteria before starting antimycobacterial treatment (10). In a previous study, we observed that antimicrobial therapy targeting *P. aeruginosa* (which is present in 58 to 78% of patients infected with *M. abscessus* [6, 9, 12, 13]) during the early stages of biofilm development inhibited *P. aeruginosa* biofilm formation but not that of *M. abscessus*, resulting in a competitive advantage for the latter (14).

Given the fact that *M. abscessus* shares an ecological niche with *P. aeruginosa* (15), patients could become infected with both bacteria from environmental reservoirs. During coinfection, *M. abscessus* would be exposed to antimicrobial treatment targeting the frequent CF pathogen *P. aeruginosa*, while *M. abscessus* infection would be missed in the absence of effective microbiological surveillance. It has been reported that antibiotic treatment in CF allows the proliferation of untargeted opportunistic bacteria (16). Therefore, this study aims to determine whether treatment of *P. aeruginosa* in an established dual-species biofilm with *M. abscessus* could give an adaptive advantage to *M. abscessus*. Furthermore, we aim to evaluate whether *P. aeruginosa* and *M. abscessus* respond differently to antibiotic treatment when cultured as a dual-species biofilm, compared to their respective single-species biofilms.

For that purpose, *P. aeruginosa* and *M. abscessus* single- and dual-species biofilms were grown and treated according to the method described by Anderl et al. (17), with

Citation Rodríguez-Sevilla G, Crabbé A, García-Coca M, Aguilera-Correa JJ, Esteban J, Pérez-Jorge C. 2019. Antimicrobial treatment provides a competitive advantage to *Mycobacterium abscessus* in a dual-species biofilm with *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e01547-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01547-19>.

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Jaime Esteban, jestebanmoreno@gmail.com.

Received 31 July 2019

Accepted 13 August 2019

Accepted manuscript posted online 26 August 2019

Published 22 October 2019

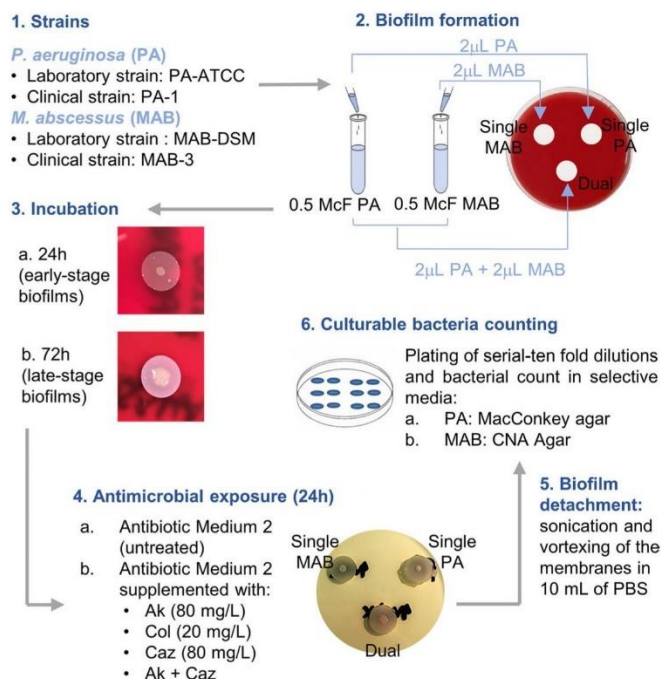


FIG 1 Overview of the methods for biofilm formation and antimicrobial treatment of the biofilms. Sterile polycarbonate membranes placed in tryptic soy agar were inoculated with 2 μ L of *M. abscessus* (MAB) and/or 2 μ L of *P. aeruginosa* (PA) bacterial suspensions. Biofilms were grown for 24 h or 72 h, and susceptibility testing of the biofilms was performed by transferring the membranes to fresh agar plates supplemented (or not) with antibiotics at the appropriate concentrations. After 24 h of treatment, the membranes were placed in separate tubes containing 10 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS), vortex mixed, and sonicated to detach all bacteria. Suspensions were then serially diluted and plated in selective media, and the number of CFU per square centimeter of each bacterium was determined. Ak, amikacin; Caz, ceftazidime; Col, colistin; McF, McFarland standard.

minor modifications (Fig. 1). Briefly, polycarbonate membranes (diameter, 13 mm; pore size, 0.2 μ m) placed on tryptic soy agar supplemented with 5% sheep blood were inoculated with 2 μ L of *P. aeruginosa* and/or 2 μ L of *M. abscessus* suspensions of laboratory (*P. aeruginosa* ATCC 27853 and *M. abscessus* subsp. *abscessus* DSM 44196) or clinical (*P. aeruginosa* PA-1 and *M. abscessus* subsp. *massiliense* MAB-3) strains. The biofilms were grown for 24 h (i.e., early-stage biofilms) or 72 h (i.e., late-stage biofilms) and then transferred to antibiotic medium 2 supplemented with antibiotics. Because the two *P. aeruginosa* strains showed different MICs for the antibiotics tested (Table 1) but were susceptible according to EUCAST breakpoints, we decided to use the EUCAST susceptibility breakpoints times 10 (amikacin, 80 mg/liter; colistin, 20 mg/liter; ceftazidime, 80 mg/liter), because our aim was to mimic therapy administered against a

TABLE 1 MIC data overview

Drug	MIC (mg/liter) ^a			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Mycobacterium abscessus</i>	
	ATCC 27853	PA-1	DSM 44196	MAB-3
Colistin	≤0.5 (S)	≤0.5 (S)	>128	>128
Amikacin	≤2 (S)	8 (S)	8 (S)	2 (S)
Ceftazidime	2 (S)	4 (S)	>128	>128

^aThe MIC values for *P. aeruginosa* laboratory and clinical strains (*P. aeruginosa* ATCC 27853 and PA-1, respectively) were determined using broth microdilution according to EUCAST guidelines (40), while the MIC values for *M. abscessus* laboratory and clinical strains (DSM 44196 and MAB-3, respectively) were determined following CLSI guidelines (25). Interpretation of the MIC (if applicable) is shown after the MIC in parentheses (S, susceptible).

TABLE 2 Effect of antimicrobial treatment on *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms

Time and treatment	Growth (log[CFU/cm ²]) ^a							
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				<i>Mycobacterium abscessus</i>			
	Single, ATCC 27853	Dual, ATCC 27853	Single, PA-1	Dual, PA-1	Single, DSM 44196	Dual, DSM 44196	Single, MAB-3	Dual, MAB-3
24 h								
Untreated	9.46 ± 0.10	9.38 ± 0.06	8.51 ± 0.12	8.65 ± 0.12	8.06 ± 0.13	6.70 ± 0.13	7.67 ± 0.41	6.94 ± 0.30
Colistin	9.31 ± 0.03	9.44 ± 0.09	8.48 ± 0.16	8.73 ± 0.09	8.02 ± 0.13	6.69 ± 0.07	7.59 ± 0.19	6.88 ± 0.22
Amikacin	6.71 ± 0.20 ^b	7.50 ± 0.51 ^c	6.84 ± 1.04	6.97 ± 0.89	4.03 ± 0.27 ^c	5.12 ± 0.46 ^c	4.89 ± 0.67 ^b	6.00 ± 0.24 ^c
Ceftazidime	7.55 ± 0.28	7.64 ± 0.29 ^c	6.92 ± 0.35	6.76 ± 0.30	7.95 ± 0.11	7.04 ± 0.07	7.15 ± 0.22	7.33 ± 0.16
Amikacin plus ceftazidime	6.37 ± 0.29 ^c	6.17 ± 0.66 ^c	5.65 ± 1.26 ^c	5.99 ± 1.66 ^c	4.17 ± 0.29 ^c	4.93 ± 0.37 ^c	4.06 ± 0.80 ^c	5.78 ± 0.30 ^c
72 h								
Untreated	9.73 ± 0.22	9.63 ± 0.32	8.99 ± 0.46	9.10 ± 0.42	9.20 ± 0.27	6.70 ± 0.45	8.72 ± 0.13	7.50 ± 0.20
Colistin	9.49 ± 0.08	9.39 ± 0.11	8.91 ± 0.51	9.35 ± 0.35	8.93 ± 0.43	6.63 ± 0.27	8.88 ± 0.01	7.41 ± 0.18
Amikacin	8.12 ± 0.66 ^c	8.00 ± 0.25 ^c	8.56 ± 0.16	8.80 ± 0.20	8.65 ± 0.11 ^b	6.20 ± 0.34	8.41 ± 0.07	7.38 ± 0.34
Ceftazidime	8.82 ± 0.36	8.61 ± 0.61 ^c	7.98 ± 0.68	8.43 ± 0.57	9.12 ± 0.19	6.96 ± 0.38	8.83 ± 0.11	7.42 ± 0.34
Amikacin plus ceftazidime	7.79 ± 0.45 ^c	7.83 ± 0.55 ^c	8.03 ± 0.70	8.37 ± 0.67	8.66 ± 0.17 ^b	6.44 ± 0.54	8.21 ± 0.12 ^b	7.27 ± 0.15

^aThe effect of antimicrobial treatment on biofilm formation was assessed based on the number of CFU per square centimeter associated with the membranes in single- and dual-species cultures of *M. abscessus* (DSM 44196 and MAB-3) and *P. aeruginosa* (ATCC 27853 and PA-1) at 24 h or 72 h of growth in the presence or absence of antibiotics. Dual-species biofilms were formed with the combinations of *M. abscessus* DSM 44196 plus *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *M. abscessus* MAB-3 plus *P. aeruginosa* PA-1. Amikacin was used at 80 mg/liter, ceftazidime at 80 mg/liter, and colistin at 20 mg/liter. Data shown are averages ($n \geq 3$) ± standard deviations.

^b $P \leq 0.05$, comparing a treated organism to its untreated control.

^c $P \leq 0.01$, comparing a treated organism to its untreated control.

susceptible *P. aeruginosa* strain. Also, another medium was introduced to simulate the treatment administered during *P. aeruginosa* exacerbation (amikacin at 80 mg/liter plus ceftazidime at 80 mg/liter) (18). After 24 h of treatment, biofilms were sampled by vigorous vortex mixing and sonication, and culturable bacteria were quantified by drop plating (19, 20) of serially diluted samples onto two selective media.

The effect of antimicrobial treatment on biofilm formation was assessed based on the number of CFU per square centimeter associated with the membrane in single- and dual-species cultures of *M. abscessus* and *P. aeruginosa*, and the results are summarized in Table 2. When bacterial biofilm formation was analyzed under untreated conditions, it was observed that, in accordance with our previous results (21), 24-h dual-species biofilms of *M. abscessus* DSM 44196 and 72-h dual-species biofilms of both strains of *M. abscessus* exhibited lower biomass, compared to single-species biofilms ($P < 0.01$). Neither early- nor late-stage single- or dual-species biofilms could be completely eradicated using clinically relevant high concentrations of the tested antibiotics (amikacin, colistin, and ceftazidime) or the combination of amikacin and ceftazidime.

Some studies suggested that antibiotic therapy could favor colonization of the lung environment by *M. abscessus* (9, 22), given its intrinsic resistance to antibiotics commonly used in CF (23); this could be due to elimination of potential competitor bacteria in the CF lung. In order to determine whether treatment with antibiotics affected the relative abundance of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* in dual-species biofilms, we analyzed the proportions of each bacterium in early- and late-stage biofilms in the absence and presence of antimicrobial treatment. Under untreated conditions, *P. aeruginosa* was always the dominant species. Following ceftazidime exposure, however, *M. abscessus* became more abundant than under control conditions in early-stage dual-species biofilms ($P \leq 0.01$). This was also seen after treatment with amikacin plus ceftazidime ($P \leq 0.01$) in dual-species biofilms of laboratory strains but could not be confirmed for the clinical pair. Late-stage laboratory strain dual-species biofilms also exhibited different relative species distributions after treatment with amikacin ($P \leq 0.05$), ceftazidime ($P \leq 0.01$), or amikacin plus ceftazidime ($P \leq 0.01$). Taken together, our data suggest that *P. aeruginosa* inhibits *M. abscessus* biofilm formation and that selectively targeting *P. aeruginosa* with antibiotics would diminish this interaction, thus increasing *M. abscessus* survival. These findings correspond to those of our previous study, in which antibiotics added during the initial formation of dual-species biofilms of

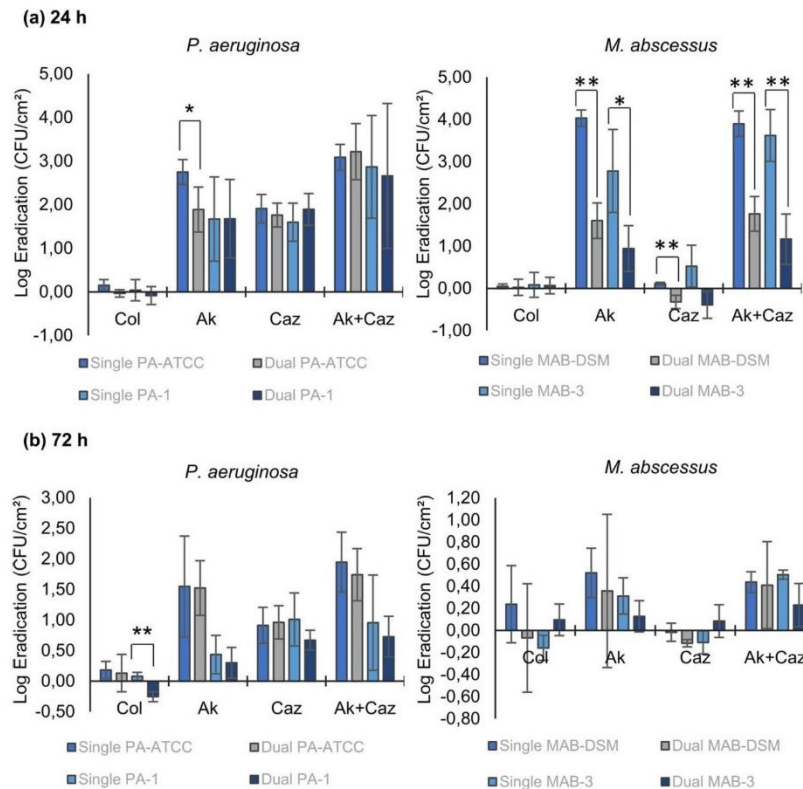


FIG 2 Influence of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* coculture on antibiotic efficacy. Comparison of the eradication ($\log[\text{CFU}/\text{cm}^2]$ untreated – $\log[\text{CFU}/\text{cm}^2]$ treated) in single- versus dual-species biofilms of *P. aeruginosa* and *M. abscessus* laboratory and clinical strains at 24 h (a) and 72 h (b) of biofilm maturation was performed. Ak, amikacin (80 mg/liter); Caz, ceftazidime (80 mg/liter); Col, colistin (20 mg/liter). *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$. Data shown are averages ($n \geq 3$); error bars indicate standard deviations.

P. aeruginosa and *M. abscessus* on lung epithelial cells selectively affected *P. aeruginosa* (14).

In order to determine whether *P. aeruginosa* and *M. abscessus* responses to antibiotics were influenced by growth in dual-species biofilms, the eradication ($\log[\text{CFU}/\text{cm}^2]$ untreated – $\log[\text{CFU}/\text{cm}^2]$ treated, using the data from Table 2) of single- versus dual-species biofilms was determined. As shown in Fig. 2, amikacin (monotherapy or combination therapy), a first-line treatment in *M. abscessus* pulmonary disease (10), demonstrated decreased efficacy against *M. abscessus* grown in early dual-species biofilms with *P. aeruginosa*. Thus, further studies were performed to determine whether the decreased susceptibility of *M. abscessus* to amikacin was due to the development of resistance mechanisms during exposure in coculture with *P. aeruginosa*.

To this end, 24-h *M. abscessus* single- and dual-species biofilms were sampled after treatment with amikacin (80 mg/liter), and the resultant suspensions were plated on different CNA agar plates to inhibit *P. aeruginosa* growth. Then, an amikacin Etest strip (bioMérieux) was placed in the agar to improve the selection of the resistant subpopulation (24), and the plates were incubated for 3 to 5 days. *M. abscessus* colonies derived from single- and dual-species biofilm suspensions that were detected in the inhibition zone of the amikacin strip underwent phenotypic amikacin susceptibility testing, following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (25), and acquired resistance to amikacin was determined by sequencing of the *rrs* gene using the GenoType NTM-DR line probe assay, version 1.0 (Hain Lifescience, Nehren, Germany). *M. abscessus* colonies isolated from the amikacin inhibition zone of both single- and dual-species biofilms did not differ substantially in their amikacin MICs, which were

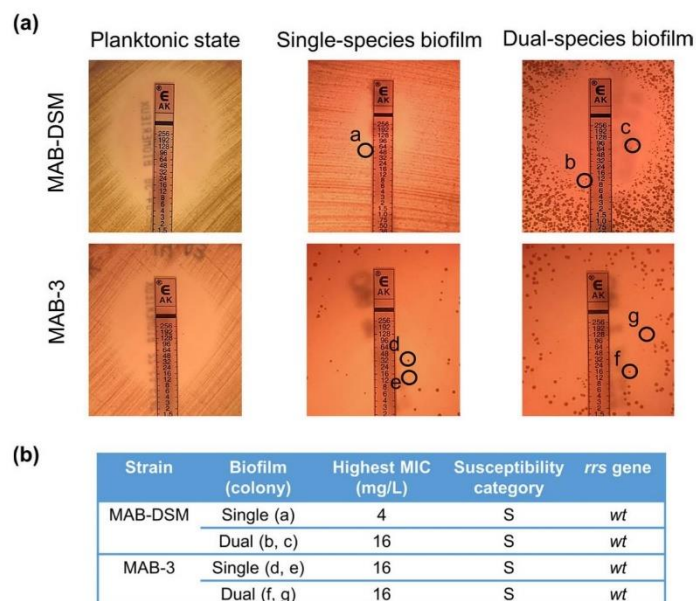


FIG 3 Investigation of *M. abscessus* amikacin-resistant subpopulations. (a) Selection of the potential mutants was made by placing an amikacin Etest strip on CNA agar. The selected colonies (a to g) underwent phenotypic susceptibility testing and genotypic studies using the GenoType NTM-DR line probe assay. (b) The highest amikacin MICs of the isolated colonies are shown, together with the type of *rrs* gene sequenced (*wt*, wild type). CLSI amikacin breakpoints were as follows: ≤ 16 mg/liter, susceptible (S); 32 mg/liter, intermediate; ≥ 64 mg/liter, resistant.

categorized as susceptible according to the CLSI guidelines (Fig. 3). Furthermore, we confirmed by *rrs* gene sequencing that acquired resistance was not involved in this phenomenon.

Therefore, tolerance and not resistance might be involved in this mechanism (26). The increased tolerance might be a result of the sum of different mechanisms, such as failure of the antibiotics to penetrate the biofilm due to the different composition of the biofilm matrix in single- versus dual-species biofilms (27–31) or suppression of aminoglycoside activity due to low pH and oxygen tension in the inner zone of the biofilm (32, 33), where *M. abscessus* was previously shown to reside (21). This altered susceptibility to amikacin in single- versus dual-species biofilms could not be observed in our previous study, in which amikacin efficacy in inhibiting biofilm formation was tested for 6 h (14).

It is known that cells growing as biofilms are phenotypically heterogeneous as biofilm development progresses (34). We assessed the effect of biofilm culture time on tolerance to antibiotics by comparing the eradication ($\log[\text{CFU}/\text{cm}^2]$ untreated – $\log[\text{CFU}/\text{cm}^2]$ treated, using the data from Table 2) of the same antibiotic therapy against 24-h and 72-h biofilms, and the results are shown in Fig. 4. Generally, *M. abscessus* and *P. aeruginosa* single- and dual-species biofilms showed reduced susceptibility to amikacin and combinations as they aged, which is in accordance with literature findings (35, 36). Previous studies suggested that the efficacy of bactericidal antibiotics against *P. aeruginosa* is related to the metabolic state of the bacteria (37, 38) and that the response to hypoxia in *M. abscessus* leads to the activation of a dormancy regulon (39). Therefore, the presence of hypoxic zones within the biofilm at 72 h would probably result in a low metabolic state of both bacteria, resulting in increased antibiotic tolerance.

In conclusion, our data demonstrate that growth in dual-species biofilms plays an important role in the antibiotic susceptibility of two important CF pathogens. Collectively, these results suggest that antibiotic therapy in CF directed at *P. aeruginosa* can lead to increased survival of *M. abscessus* in dual-species biofilms, which could contribute to the

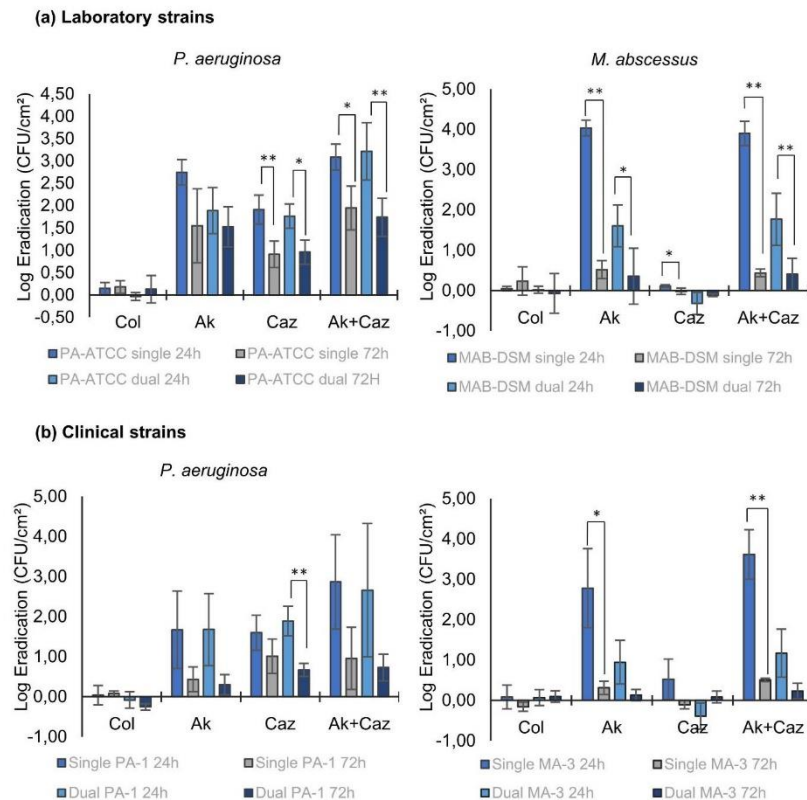


FIG 4 Influence of biofilm culture time on antibiotic efficacy against *P. aeruginosa* and *M. abscessus* single- and dual-species biofilms. Comparison of the eradication ($\log[\text{CFU}/\text{cm}^2]$ untreated – $\log[\text{CFU}/\text{cm}^2]$ treated) following antibiotic treatment of early-stage versus late-stage laboratory (a) and clinical (b) strain single- and dual-species biofilms of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* was performed. Ak, amikacin (80 mg/liter); Caz, ceftazidime (80 mg/liter); Col, colistin (20 mg/liter). *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$. Data shown are averages ($n \geq 3$); error bars indicate standard deviations.

initiation of NTM pulmonary disease. However, the model used is a simplification of the reality, and the outcome could be different in a more physiologically relevant model.

ACKNOWLEDGMENTS

This research received funds from a grant from the Instituto de Salud Carlos III (PI18/01068).

We are grateful to Esther Ruiz and África Bodas (IIS-Fundación Jiménez Díaz) for their excellent technical support. The *Pseudomonas aeruginosa* clinical strain was kindly provided by the Cystic Fibrosis Unit of La Paz Hospital (Madrid).

J.E. received travel grants from bioMérieux, Pfizer, and Sysmex and advisory fees from Sysmex. The other authors have no conflicts to declare.

REFERENCES

- Lipuma JJ. 2010. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 23:299–323. <https://doi.org/10.1128/CMR.00068-09>.
- Mahenthalingam E. 2014. Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome. *Paediatr Respir Rev* 15(Suppl 1):13–15. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2014.04.006>.
- Heirali A, McKeon S, Purighalla S, Storey DG, Rossi L, Costilhes G, Drews SJ, Rabin HR, Surette MG, Perkins MD. 2016. Assessment of the microbial constituents of the home environment of individuals with cystic fibrosis (CF) and their association with lower airways infections. *PLoS One* 11:e0148534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148534>.
- Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Jr, Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Handler A, Wilson RW, Schechter MS, Edwards LJ, Chakraborti S, Knowles MR. 2003. Nontuberculous mycobacteria. I. Multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167:828–834. <https://doi.org/10.1164/rccm.200207-678OC>.
- Adjemian J, Olivier KN, Seitz AE, Holland SM, Prevots DR. 2012. Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries. *Am J Respir Crit Care Med* 185:881–886. <https://doi.org/10.1164/rccm.201111-2016OC>.
- Esther CR, Jr, Esserman DA, Gilligan P, Kerr A, Noone PG. 2010. Chronic *Mycobacterium abscessus* infection and lung function decline in cystic

- fibrosis. *J Cyst Fibros* 9:117–123. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2009.12.001>.
7. Rodman DM, Polis JM, Heltshe SL, Sontag MK, Chacon C, Rodman RV, Brayshaw SJ, Huitt GA, Iseman MD, Saavedra MT, Taussig LM, Wagener JS, Accurso FJ, Nick JA. 2005. Late diagnosis defines a unique population of long-term survivors of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 171:621–626. <https://doi.org/10.1164/rccm.200403-404OC>.
 8. Roux AL, Catherinot E, Ripoll F, Soismier N, Macheras E, Ravilly S, Bellis G, Vibet MA, Le Roux E, Lemonnier L, Gutierrez C, Vincent V, Fauroux B, Rottman M, Guillemot D, Gaillard JL, Herrmann J-L. 2009. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. *J Clin Microbiol* 47:4124–4128. <https://doi.org/10.1128/JCM.01257-09>.
 9. Catherinot E, Roux AL, Vibet MA, Bellis G, Ravilly S, Lemonnier L, Le Roux E, Bernede-Bauduin C, Le Bourgeois M, Herrmann JL, Guillemot D, Gaillard JL. 2013. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* complex target distinct cystic fibrosis patient subpopulations. *J Cyst Fibros* 12:74–80. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.06.009>.
 10. Floto RA, Olivier KN, Saiman L, Daley CL, Herrmann JL, Nick JA, Noone PG, Bilton D, Corris P, Gibson RL, Hempstead SE, Koetz K, Sadosky KA, Sermet-Gaudelus I, Smyth AR, van Ingen J, Wallace RJ, Winthrop KL, Marshall BC, Haworth CS. 2016. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of nontuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax* 71(Suppl 1):i1–i22. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207360>.
 11. Haworth CS, Banks J, Capstick T, Fisher AJ, Gorsuch T, Laurenson IF, Leitch A, Loebeinger MR, Milburn HJ, Nightingale M, Ormerod P, Shingadia D, Smith D, Whitehead N, Wilson R, Floto RA. 2017. British Thoracic Society Guideline for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *BMJ Open Respir Res* 4:e000242. <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2017-000242>.
 12. Binder AM, Adjemian J, Olivier KN, Prevots DR. 2013. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infections and associated chronic macrolide use among persons with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 188:807–812. <https://doi.org/10.1164/rccm.201307-1200OC>.
 13. Adjemian J, Olivier KN, Prevots DR. 2018. Epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial sputum positivity in patients with cystic fibrosis in the United States, 2010–2014. *Ann Am Thorac Soc* 15: 817–826. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201709-727OC>.
 14. Rodríguez-Sevilla G, Rigauts C, Vandeplasche E, Ostyn L, Mahillo-Fernandez I, Esteban J, Peremarch CP, Coenye T, Crabbe A. 2018. Influence of three-dimensional lung epithelial cells and interspecies interactions on antibiotic efficacy against *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog Dis* 76:fty034. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty034>.
 15. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, Rottman M, Macheras E, Heym B, Herrmann JL, Daffe M, Brosch R, Risler JL, Gaillard JL. 2009. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* 4:e5660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005660>.
 16. Li J, Hao C, Ren L, Xiao Y, Wang J, Qin X. 2016. Data mining of lung microbiota in cystic fibrosis patients. *PLoS One* 11:e0164510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164510>.
 17. Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1818–1824. <https://doi.org/10.1128/aac.44.7.1818-1824.2000>.
 18. Bhatt JM. 2013. Treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev* 22:205–216. <https://doi.org/10.1183/09059180.00006512>.
 19. Naghili H, Tajik H, Mardani K, Razavi Rouhani SM, Ehsani A, Zare P. 2013. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Vet Res Forum* 4:179–183.
 20. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods* 44: 121–129. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4).
 21. Rodríguez-Sevilla G, García-Coca M, Romera-García D, Aguilera-Correa JJ, Mahillo-Fernandez I, Esteban J, Perez-Jorge C. 2018. Non-tuberculous mycobacteria multispecies biofilms in cystic fibrosis: development of an in vitro *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa* dual species biofilm model. *Int J Med Microbiol* 308:413–423. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.03.003>.
 22. Viviani L, Harrison MJ, Zolin A, Haworth CS, Floto RA. 2016. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) amongst individuals with cystic fibrosis (CF). *J Cyst Fibros* 15:619–623. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2016.03.002>.
 23. Nessar R, Cambau E, Reyat JM, Murray A, Gicquel B. 2012. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother* 67:810–818. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr578>.
 24. Macia MD, Borrell N, Perez JL, Oliver A. 2004. Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the Etest and disk diffusion. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2665–2672. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2665-2672.2004>.
 25. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard—2nd ed. CLSI document M24-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 26. Olsen I. 2015. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34:877–886. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z>.
 27. Adam B, Baillie GS, Douglas LJ. 2002. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 51:344–349. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-4-344>.
 28. Maunders E, Welch M. 2017. Matrix exopolysaccharides: the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 364:fnx120. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx120>.
 29. Esteban J, García-Coca M. 2017. Mycobacterium biofilms. *Front Microbiol* 8:2651. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02651>.
 30. Allison DG, Matthews MJ. 1992. Effect of polysaccharide interactions on antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Bacteriol* 73:484–488. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb05009.x>.
 31. Burmolle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sorensen SJ, Kjelleberg S. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol* 72:3916–3923. <https://doi.org/10.1128/AEM.03022-05>.
 32. Bryant RE, Fox K, Oh G, Morthland VH. 1992. β -Lactam enhancement of aminoglycoside activity under conditions of reduced pH and oxygen tension that may exist in infected tissues. *J Infect Dis* 165:676–682. <https://doi.org/10.1093/infdis/165.4.676>.
 33. Schlessinger D. 1988. Failure of aminoglycoside antibiotics to kill anaerobic, low-pH, and resistant cultures. *Clin Microbiol Rev* 1:54–59. <https://doi.org/10.1128/cmr.1.1.54>.
 34. Stewart PS, Franklin MJ. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6:199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>.
 35. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. 2004. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2659–2664. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2659-2664.2004>.
 36. Anwar H, van Biesen T, Dasgupta M, Lam K, Costerton JW. 1989. Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system. *Antimicrob Agents Chemother* 33:1824–1826. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.10.1824>.
 37. Rittershaus ES, Baek SH, Sassetti CM. 2013. The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell Host Microbe* 13: 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.012>.
 38. Lobritz MA, Belenky P, Porter CB, Gutierrez A, Yang JH, Schwarz EG, Dwyer DJ, Khalil AS, Collins JJ. 2015. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:8173–8180. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509743112>.
 39. Miranda-CasoLuengo AA, Staunton PM, Dinan AM, Lohan AJ, Loftus BJ. 2016. Functional characterization of the *Mycobacterium abscessus* genome coupled with condition specific transcriptomics reveals conserved molecular strategies for host adaptation and persistence. *BMC Genomics* 17:553. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2868-y>.
 40. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2018. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf.

Discusión

El aumento en el número de casos de enfermedad pulmonar por *M. abscessus*, notablemente entre pacientes jóvenes, se perfila como un grave problema de salud entre los individuos con FQ debido a su impacto en la función pulmonar y a su elevada resistencia al tratamiento antimicrobiano [9-11]. Hoy día, sabemos que los pulmones de los pacientes con FQ están habitualmente colonizados por bacterias que forman *biofilms* polimicrobianos [3, 172, 202, 203]. Sin embargo, a pesar de los múltiples estudios existentes en este campo, no se conocen las características de los *biofilms* formados por *M. abscessus* con otras bacterias con las que comparte nicho.

Entre un 58 y un 78% de los pacientes colonizados por *M. abscessus* están coinfectados con *P. aeruginosa*, patógeno clásico en FQ [10, 93, 204, 205]. Se sabe que *M. abscessus* y *P. aeruginosa* comparten nicho en el medio ambiente, probablemente formando *biofilms* multiespecie [79]. Además, *M. abscessus* posee factores de patogenicidad adquiridos mediante transferencia horizontal de bacilos Gram negativos no fermentadores, como *P. aeruginosa* o el complejo *B. cepacia*, que facilitan su adaptación a las vías respiratorias de pacientes con FQ [79], lo que apoya la teoría de una coexistencia cercana de estos microorganismos en diferentes nichos en forma de *biofilms*. Hasta ahora, lo único que conocemos de la interacción entre *M. abscessus* y *P. aeruginosa* es que *M. abscessus* subesp. *abscessus* produce una enzima, AqDC, capaz de degradar dos moléculas que participan en el sistema de *quorum sensing* de *P. aeruginosa*, PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal, 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona) y HHQ (2-heptil-4-quinolona) [206]. Si bien esto *a priori* sugiere una ventaja competitiva frente a *P. aeruginosa*, se ha demostrado que la reducción de PQS no es suficiente para interferir con la síntesis de los factores de virulencia que regula (piocianina, pioverdina y ramnolípidos) [207].

Para responder a nuestra hipótesis desarrollamos un modelo simple, pero que imita determinados aspectos de la formación de *biofilms in vivo* [208], que nos permitió estudiar las características fenotípicas del *biofilm* dual formado por ambas especies utilizando membranas

de policarbonato. Comprobamos que ambas especies eran capaces de formar un *biofilm* dual a los tres tiempos estudiados (24, 48 y 72 h). Además, la concentración inicial creciente de *M. abscessus* empleada para la formación de los *biofilms* duales sólo aumentó la presencia de *M. abscessus* en aquellos cultivados durante 24 y 48 h. Sin embargo, el inóculo de partida no afectó la densidad bacteriana obtenida en *biofilms* madurados durante 72h. Igualmente, el tiempo de incubación del *biofilm* incrementó la cantidad de ambas bacterias en el *biofilm* dual, observándose las mayores diferencias cuando se comparó la densidad bacteriana obtenida a las 24 con la obtenida tras 72h de incubación. Teniendo en cuenta todos estos datos, establecimos que a las 24h de incubación estaríamos ante *biofilms* tempranos, en los que la composición de la comunidad todavía es variable, mientras que a las 72h de incubación estaríamos ante una comunidad en la que la composición relativa de las especies permanece estable, independientemente de las condiciones experimentales de partida.

Cuando comparamos el crecimiento de cada una de las especies en *biofilms* monomicrobianos con el obtenido en *biofilms* duales en ausencia de tratamiento antimicrobiano, observamos que *P. aeruginosa* inhibe el desarrollo de la población de *M. abscessus* en el *biofilm* dual sistemáticamente a partir de las 24h de incubación, mientras que la densidad bacteriana de *P. aeruginosa* no se modifica sustancialmente cuando crece con la micobacteria. Es posible determinar la interacción que existe entre especies mediante el estudio de su disposición espacial en *biofilms* [5]. Con ese propósito, realizamos dos técnicas de imagen combinadas con una tinción selectiva de cada uno de los microorganismos: un estudio de una sección longitudinal del *biofilm* mediante microscopía óptica (aproximación histológica), y otro utilizando microscopía confocal. Ambos estudios confirmaron una estructura estratificada del *biofilm*, en la que la presencia de *M. abscessus* se restringía a las capas inferiores del *biofilm*, con agregados dispersos en capas superiores, mientras que *P. aeruginosa* crecía abundantemente en la zona superior. Estos resultados sugieren que la relación que se establece entre ambas bacterias es una relación de explotación, generalmente marcada por una débil cooperación

metabólica entre especies [209]. Este fenómeno en el que la bacteria dominante en un *biofilm* dual restringe el crecimiento de la otra especie y la “tapiza” se denomina *layering* o *blanketing* (estratificación), y fue descrito por primera vez en un *biofilm* dual formado por *P. aeruginosa* y el microorganismo ambiental *Agrobacterium tumefaciens*, en el que *P. aeruginosa* fue la especie dominante debido a la expresión de mecanismos de movilidad mediados por *quorum sensing* [210]. Probablemente, en nuestro modelo también se cumplan las mismas condiciones para que *P. aeruginosa* presente una ventaja en términos de movilidad frente a *M. abscessus*, ya que ésta no tiene apéndices de movilidad, y, además, su tasa de crecimiento es menor [211, 212].

La colonización bacteriana de una superficie es el primer paso para el cambio de un estado de vida planctónico a uno sésil, y puede realizarse de forma activa, si las bacterias poseen apéndices de movilidad, o de forma pasiva, aunque menos eficiente, gracias las fuerzas gravitacionales y al movimiento browniano [129]. Una vez alcanzada la superficie, la adhesión a la misma depende de diferentes factores: si la superficie colonizada es abiótica, entonces depende, mayoritariamente, de la polaridad y de la carga de ambos componentes [213, 214]; sin embargo, la asociación con una superficie biótica es un proceso complejo que puede estar mediado por moléculas específicas y que, además, puede modificarse por la respuesta del huésped a la infección [215]. Una de las características que diferencian a las micobacterias es la alta composición lipídica de su pared celular externa, que permite su adherencia a diferentes superficies en un corto período de tiempo [216-218]. Diferentes autores han confirmado la capacidad de adherencia de *M. abscessus* a diversas superficies (policloruro de vinilo, vidrio, cobre, acero galvanizado con zinc, acero inoxidable, polipropileno) [216, 219, 220], lo que constituye el primer paso de la formación del *biofilm* en estos materiales. Cuando analizamos los resultados obtenidos en la formación de *biofilms* duales de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* en superficies abióticas (*i.e.*, poliestireno) en ausencia de antimicrobianos, observamos que el crecimiento de ambas especies no se modificó cuando se comparó con sus respectivos *biofilms* monomicrobianos a las 6h de incubación. Teniendo en cuenta el corto período de tiempo

empleado para la formación de los *biofilms*, cabría esperar que *P. aeruginosa*, que posee una tasa de crecimiento mayor y dos tipos de apéndices de movilidad (un flagelo polar y pili de tipo IV) [221, 222], hubiera inhibido en parte la formación de *biofilms* de *M. abscessus*. Sin embargo, es posible que esto haya sido contrarrestado por las características de la pared celular de la cepa de morfotipo liso utilizada de *M. abscessus*, que, aparte de su hidrofobicidad intrínseca, está recubierta con GPL, molécula que se relaciona con la dispersión del *biofilm* y la colonización de nuevas superficies al facilitar la movilidad de tipo deslizamiento [218, 220, 223-225]. No obstante, *P. aeruginosa* sí disminuyó la capacidad de asociación de *M. abscessus* con las células epiteliales de pulmón, probablemente por saturación de los sitios de unión gracias a una rápida ocupación de los mismos [226].

M. abscessus es intrínsecamente resistente a la mayoría de antimicrobianos disponibles [9]. Por ello, el tratamiento de la enfermedad pulmonar por esta micobacteria dura, como mínimo, 12 meses e incluye la combinación de diferentes agentes antimicrobianos (claritromicina o azitromicina y amikacina junto con (i) imipenem, cefoxitina y/o tigeciclina en la fase intensiva o (ii) minociclina, clofazimina, moxifloxacino y/o linezolid en la fase de continuación), cuya elección está guiada por las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos realizadas *in vitro* [12]. Sin embargo, la tasa de fallo terapéutico es elevada y, además, es frecuente la aparición de toxicidad relacionada con la medicación [12, 227].

Recientemente, se ha demostrado que *M. abscessus* se encuentra formando *biofilms* en las paredes alveolares de los pacientes con FQ y en los pulmones de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica [80, 228], pudiendo ser ésta una de las causas de la falta de correlación de la sensibilidad obtenida *in vitro* y los resultados *in vivo* [229-231]. En diferentes estudios, se ha observado que los *biofilms* de *M. abscessus* son extremadamente resistentes a la acción de antimicrobianos y desinfectantes, comparado con su crecimiento en estado planctónico, utilizando diferentes modelos experimentales [219, 232-236]. Preocupantemente, esta falta de eficacia del tratamiento antimicrobiano se extiende a los antibióticos utilizados

como primera línea frente al tratamiento de la infección pulmonar por este microorganismo, claritromicina/azitromicina y amikacina, que no han demostrado ser capaces de erradicar *biofilms* de *M. abscessus* en los estudios consultados, a pesar de que las cepas en estado planctónico fueran categorizadas como sensibles a los mismos [232-236].

En nuestro estudio observamos que ni claritromicina ni amikacina empleados a una concentración de, al menos, 10 veces la CMI, son capaces de erradicar completamente los *biofilms* de cepas colección o cepas clínicas de *M. abscessus* formados durante 24 o 72h. Claritromicina únicamente tiene un leve efecto frente a *biofilms* tempranos de la cepa colección de *M. abscessus*, produciendo una reducción de 0,39 logs comparado con su control sin tratar. Amikacina es más efectiva, ya que presenta actividad frente a *biofilms* tempranos de ambas cepas de *M. abscessus*, reduciendo su densidad microbiana 4 logs en cepas colección y 2,8 en cepas clínicas. Sin embargo, su efectividad es menor frente a *biofilms* tardíos, reduciendo 0,52 logs el *biofilm* de la cepa colección de *M. abscessus*. La heterogeneidad fisiológica y metabólica de un *biofilm* se establece conforme el *biofilm* se desarrolla, contribuyendo de esta forma el tiempo de maduración a la tolerancia a antimicrobianos [229, 231]. Con el tiempo, la población bacteriana y el grosor del *biofilm* aumentan, lo que provoca que los microorganismos presentes en el interior de *biofilm* tengan bajas tasas actividad metabólica debido, en parte, a la disminución de la tensión de oxígeno, que es consumido por las bacterias presentes en las zonas periféricas. Las micobacterias son organismos aerobios estrictos, sin embargo, tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones de hipoxia, como las que se encuentran en el interior del *biofilm* [237, 238]. En ausencia de oxígeno, *M. abscessus* activa un regulón, DosR, que lo lleva a un estado de latencia, lo que supone una estrategia de persistencia en el huésped [239] y, probablemente, lo protege de la acción de los aminoglucósidos, como se observa en un artículo publicado recientemente por Kolpen *et al.* [240]. En conjunto, estos resultados subrayan la importancia de la instauración de un diagnóstico temprano de la infección por *M. abscessus*, ya que un retraso en el tratamiento contribuiría al incremento de la tolerancia a amikacina, que es

el antimicrobiano con mayor actividad en nuestro modelo frente a *biofilms* jóvenes, y al establecimiento de la infección crónica.

Además, sabemos que el pulmón de los pacientes con FQ alberga una comunidad polimicrobiana, el microbioma pulmonar, cuya interacción puede modificar las características fenotípicas individuales de las bacterias, como la respuesta a antimicrobianos [241]. Sin embargo, no existen estudios que evalúen cómo afectan los microorganismos con los que *M. abscessus* habitualmente comparte nicho a su sensibilidad a antimicrobianos, ni si *M. abscessus* influye en la sensibilidad de otros. Cuando comparamos los datos de sensibilidad en *biofilms* monomicrobianos con los obtenidos cuando el tratamiento antibiótico se aplica a *biofilms* duales, observamos que *P. aeruginosa* reduce drásticamente la sensibilidad de los *biofilms* tempranos de *M. abscessus* a amikacina, ejerciendo un efecto protector frente a este antimicrobiano. Para determinar si el mecanismo implicado en este fenómeno es el desarrollo de resistencia (adquirida o adaptativa) o el aumento de la tolerancia, secuenciamos el gen *rrs*, relacionado con la resistencia adquirida a aminoglucósidos en *M. abscessus*, y monitorizamos la CMI de los aislados de los *biofilms* monomicrobianos y duales tras el tratamiento con amikacina durante 24h. Observamos que en ninguno de los aislados se produjo una mutación en el gen, y que no existía un incremento significativo en las CMI de los aislados de *biofilms* duales que pudiera explicar la reducción de la sensibilidad a amikacina, lo que sugiere que el mecanismo más probablemente implicado es el incremento de la tolerancia. Es posible explicar este aumento de la tolerancia a amikacina en *biofilms* duales por la disposición de las especies en el *biofilm*: debido a la relación de explotación que se establece entre ambas bacterias, *M. abscessus* reside en el interior del *biofilm*, por lo que se expone de una forma más temprana a una baja tensión de oxígeno, que sería rápidamente consumido por *P. aeruginosa* en la periferia. Esto provocaría una modificación del metabolismo de la micobacteria y, por ende, de su estado fisiológico, lo que aumentaría la tolerancia a amikacina. Un fenómeno similar tiene lugar en *biofilms* de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, en los que se ha observado que determinados

exoproductos de *P. aeruginosa*, entre los que se encuentra HQNO (N-óxido de 2-heptil-4-hidroxiquinolina), inhiben la respiración aerobia de *S. aureus* y producen una depleción de ATP intracelular, incrementando su tolerancia a antimicrobianos [176, 187]. Otro factor que podría contribuir al incremento de la tolerancia a amikacina de *M. abscessus* es la modificación de la matriz extracelular en el *biofilm* dual, ya que la composición de la misma es especie-dependiente, y se sabe que determinados componentes de la matriz celular de *P. aeruginosa* interfieren con la actividad de los aminoglucósidos [149, 242], y protegen a otras especies en etapas iniciales de la formación del *biofilm* multiespecie [243]. Asimismo, también observamos que la sensibilidad de *P. aeruginosa* se modifica significativamente cuando crece con *M. abscessus*. Los resultados muestran una disminución de la sensibilidad de *biofilms* tempranos de la cepa colección a amikacina, y de *biofilms* tardíos a colistina. Sin embargo, no se observó en las otras cepas, sugiriendo un efecto cepa-dependiente. Estos resultados subrayan la necesidad de conocer cómo las especies coinfectantes afectan a la sensibilidad a antimicrobianos de una especie diana, ya que la interacción entre ellas podría contribuir al fallo terapéutico.

Una de las estrategias para evitar la formación de *biofilms* podría ser el tratamiento con antimicrobianos antes de la instauración. Por ello, también evaluamos la actividad de los mismos antimicrobianos (*i.e.*, claritromicina, amikacina, ceftazidima, colistina) en la inhibición de la formación de *biofilms* monomicrobianos y duales, y cómo ésta se veía influenciada por la interacción entre especies. Para ello, y puesto que necesitábamos que quedaran bacterias cultivables tras el tratamiento para evaluar esta interacción, utilizamos una concentración de cada antimicrobiano que inhibiera en aproximadamente 2 logaritmos la formación de *biofilm* monomicrobiano de *P. aeruginosa* en poliestireno. En un estudio previo realizado por da Costa-Flores *et al.*, tanto amikacina como claritromicina fueron capaces de inhibir la formación del *biofilm* de *M. abscessus* a concentraciones de 0,5 y 2 µg/mL, respectivamente [236]. Nosotros observamos que colistina, amikacina y claritromicina empleados frente a *biofilms* monomicrobianos de *M. abscessus* aumentaron significativamente el número de bacterias

asociadas con la superficie de poliestireno, sugiriendo un efecto inductor de la formación del *biofilm* en superficies plásticas. Este efecto se ha descrito previamente a concentraciones subinhibitorias [244], y, aunque sea justificable en antimicrobianos sin actividad frente a *M. abscessus*, como colistina, no se esperaba encontrarlo con claritromicina y amikacina, que se emplearon a 8,5 y 36,7 veces la CMI, respectivamente. Además, amikacina se empleó a una concentración mayor que la que produjo inhibición en el ensayo de da Costa-Flores *et al.* (17 vs 0,5 µg/mL), lo que pone de manifiesto las diferencias obtenidas entre estudios en función de la metodología utilizada para la formación de los *biofilms*, si bien claritromicina se empleó a una concentración menor (1,1 vs 2 µg/mL). Cuando realizamos el estudio de inhibición con antimicrobianos incorporando a *P. aeruginosa*, observamos que amikacina y claritromicina seguían aumentando significativamente la presencia de *M. abscessus* en el *biofilm* dual. Además, observamos que existía una modificación de la respuesta de *M. abscessus* a ceftazidima: en presencia de *P. aeruginosa*, el *biofilm* de *M. abscessus* no se inducía, sino que se inhibía ligeramente, aunque ceftazidima *per se* no tenía una actividad significativa en la inhibición de *M. abscessus* en el *biofilm* dual. La respuesta a antimicrobianos de *P. aeruginosa*, sin embargo, no se modificó por la presencia de *M. abscessus*.

Sabemos que las diferentes condiciones en las que se estudian los microorganismos influyen en sus características fenotípicas, por lo que, para mimetizar la respuesta a antimicrobianos de una especie en particular *in vivo*, es importante imitar el microambiente presente en el huésped *in vitro*. Los modelos celulares 3-D imitan la arquitectura tridimensional y la complejidad multicelular el tejido parental, lo que supone una mejor replicación de las condiciones fisiológicas a las que el microorganismo se expone durante la terapia, y se traduce en una mejor correlación de los resultados *in vitro-in vivo* [6, 124, 245]. En los últimos años, se han realizado estudios con el fin de comparar la respuesta a antimicrobianos en *biofilms* de *P. aeruginosa* cultivados en superficies abióticas con la obtenida cuando se cultivan incorporando células epiteliales del huésped. En ellos, se ha observado que la respuesta a antimicrobianos,

especialmente aminoglucósidos, es mayor cuando *P. aeruginosa* se cultiva en un modelo 3-D de células epiteliales de pulmón [200, 201]. Con el objetivo de estudiar el papel de las células epiteliales del huésped en la respuesta a antimicrobianos, realizamos el mismo estudio de inhibición utilizando un modelo 3-D de células epiteliales de pulmón y lo comparamos con los obtenidos cuando los *biofilms* se formaron en plástico. En términos generales, la antibioterapia fue más efectiva inhibiendo la formación de *biofilms* en el modelo celular 3-D. Notablemente, *P. aeruginosa* fue más sensible a la acción de ceftazidima en *biofilms* monomicrobianos y a colistina en *biofilms* duales. Esto contrasta con los resultados obtenidos en el estudio realizado por Crabbé *et al.* en 2017 con la cepa de laboratorio PAO1 [201], en los que no se observó este efecto tras el tratamiento con ceftazidima, sugiriendo un efecto cepa-dependiente. Esta mayor actividad observada en el modelo celular puede deberse a interacciones sinérgicas con los péptidos antimicrobianos sintetizados por las células epiteliales [246], o a la modificación de las condiciones intracelulares del microorganismo, como se observó en el segundo estudio realizado por Crabbé *et al.* en este ámbito [200]. Sin embargo, claritromicina perdió su efectividad contra *P. aeruginosa* en el modelo celular, lo que puede explicarse por la habilidad que tienen los macrólidos de concentrarse en las células del huésped [247], que reduciría su biodisponibilidad en el medio de cultivo.

Cuando evaluamos la respuesta a antimicrobianos en el modelo más relevante fisiológicamente, observamos que los antimicrobianos tampoco inhibieron significativamente la asociación de *M. abscessus* con células epiteliales de pulmón, si bien no observamos la inducción del *biofilm* evidenciada en plástico. Además, también observamos modificaciones en la respuesta antibióticos de *M. abscessus* cuando creció con *P. aeruginosa*. En este caso, *M. abscessus* aumentó su asociación con las células epiteliales de pulmón tras el tratamiento del *biofilm* dual con colistina. Estas diferencias obtenidas entre modelos ponen de manifiesto la influencia de las células del huésped en el fenotipo de los microorganismos estudiados, y, por ende, en la

respuesta a antimicrobianos, lo que podría traducirse en una mejor correlación de los resultados obtenidos *in vitro* con la respuesta *in vivo*.

La instauración temprana de un tratamiento antibiótico dirigido a los patógenos habituales ha contribuido notoriamente a la mejora de la calidad y de la esperanza de vida de los pacientes con FQ, enlenteciendo el avance del daño pulmonar. En el caso de la infección por *P. aeruginosa*, la terapia antimicrobiana para su erradicación temprana, el tratamiento supresor en la infección crónica y el tratamiento antimicrobiano de las exacerbaciones son recomendaciones universales en las guías consenso [65, 66, 248]. Por tanto, los pacientes con FQ se exponen desde una temprana edad a tratamientos frecuentes y prolongados con antimicrobianos. Con el aumento de la esperanza de vida, la presión antibiótica sobre los microorganismos de la microbiota pulmonar aumenta, y, con ella, la posibilidad de selección de cepas resistentes y de emergencia de mecanismos de resistencia. Una de las teorías que trata de explicar el aumento en el número de casos de enfermedad pulmonar por *M. abscessus* en pacientes con FQ es el incremento en el uso de antimicrobianos [93, 107], lo que crearía un nicho favorable para *M. abscessus*, dada su elevada resistencia al tratamiento.

En nuestros estudios, tratamos de evaluar *in vitro* si el tratamiento dirigido a *P. aeruginosa* podría incrementar la presencia de *M. abscessus* en el *biofilm* dual. Para ello, empleamos: (i) colistina, utilizada tanto en el tratamiento de la infección crónica como en la erradicación inicial de la colonización, y (ii) dos antimicrobianos usados para el tratamiento intravenoso de las exacerbaciones graves, amikacina y ceftazidima [65, 66, 248, 249]. Observamos que, en ambos modelos de inhibición de la formación del *biofilm* dual (plástico y células), el tratamiento con antibióticos durante el desarrollo del *biofilm* inhibió específicamente la formación del *biofilm* de *P. aeruginosa*, pero no la de *M. abscessus*, que permaneció intacta, lo que resulta una ventaja competitiva para este último. En el modelo de erradicación se evidencia que, a pesar de que en ausencia de antimicrobianos *P. aeruginosa* es la bacteria dominante en el *biofilm* dual, la exposición de los *biofilms* tempranos a ceftazidima y a la combinación ceftazidima/amikacina y

de los *biofilms* maduros a ceftazidima, amikacina y a la combinación ceftazidima/amikacina, modifica la distribución relativa de las especies en la comunidad, aumentando notablemente la supervivencia de *M. abscessus* en el *biofilm* dual. Teniendo en cuenta que *P. aeruginosa* y *M. abscessus* establecen una relación de explotación cuando forman *biofilms* duales, el mecanismo más probablemente implicado en el aumento de supervivencia de *M. abscessus* sería la inhibición específica de *P. aeruginosa* por los antimicrobianos, lo que reduciría la interacción competitiva, y resultaría en una ventaja competitiva para *M. abscessus*.



Conclusiones

1. *M. abscessus* y *P. aeruginosa* son capaces de formar comunidades duales en diferentes condiciones, lo que apoya la teoría de una potencial coexistencia estrecha de ambas bacterias en diferentes nichos en forma de *biofilms* multiespecie.
2. Nuestros estudios apoyan el uso de las técnicas de imagen en *biofilms* para examinar el tipo de interacción interespecífica que existe entre dos microorganismos. Basándonos en la disposición espacial de cada una de las especies en el *biofilm* dual, la relación que se establece entre ambas es una explotación, que se confirma con el menor recuento de colonias de *M. abscessus* cuando crece formando *biofilms* duales con *P. aeruginosa*.
3. Las interacciones que se establecen entre ambas bacterias modifican la respuesta a antimicrobianos, siendo la más reseñable la disminución de la sensibilidad de *M. abscessus* a amikacina. Esto, sumado al aumento de la tolerancia a antimicrobianos típica del crecimiento en forma de *biofilm*, podría explicar la alta tasa de fallo terapéutico observada en pacientes con enfermedad pulmonar por *M. abscessus*, y subraya la importancia de estudiar las interacciones entre especies coinfectantes cuando se evalúa la eficacia de un antimicrobiano.
4. La falta de respuesta de *M. abscessus* a amikacina en *biofilms* duales se debe a un aumento de tolerancia, probablemente debido a una disminución del oxígeno disponible en las capas inferiores del *biofilm*. Esto puede suponer una línea de investigación futura, en la que se evalúe el efecto de los antimicrobianos en *biofilms* polimicrobianos teniendo en cuenta la distribución espacial de los microorganismos coinfectantes.
5. La tolerancia a antimicrobianos en *biofilms* aumenta con el tiempo de cultivo, lo que se traduce en la necesidad de instaurar un tratamiento temprano para prevenir o retrasar la implementación de la infección pulmonar crónica por *M. abscessus*, y resalta la importancia de estudiar las características fenotípicas de los *biofilms* en sus diferentes etapas de maduración.

Conclusiones

6. Las interacciones entre las bacterias y las células epiteliales de pulmón del huésped modifican la respuesta de *M. abscessus* y *P. aeruginosa* a antimicrobianos. Notablemente, *P. aeruginosa* fue más sensible a la acción de ceftazidima en *biofilms* monomicrobianos y a colistina en *biofilms* duales, mientras que en presencia de las células epiteliales del pulmón el *biofilm* de *M. abscessus* no se inducía.
7. Nuestros resultados subrayan la importancia de estudiar la influencia del microambiente del huésped en la sensibilidad a antimicrobianos, así como la trascendencia del desarrollo de modelos que permitan la correlación entre los estudios *in vitro* y los resultados *in vivo* en infecciones difíciles de tratar.
8. La terapia antimicrobiana dirigida a *P. aeruginosa* aumenta la supervivencia de *M. abscessus* en el *biofilm* dual por disminución de la interacción competitiva entre ambas especies en todos los modelos estudiados. Esto sugiere que el tratamiento con antimicrobianos en las diferentes etapas de establecimiento de los *biofilms* podría favorecer la colonización pulmonar por *M. abscessus*.



Conclusions

1. *M. abscessus* and *P. aeruginosa* can develop dual species communities under different conditions, which supports the theory of a close coexistence of both bacteria in different niches in the form of multispecies biofilms.
2. Our studies support the use of biofilm imaging techniques to examine the type of interspecific interaction that exists between microorganisms. Based on the spatial disposition of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* in dual-species biofilms, the relationship that is established between both species is an exploitation, which is confirmed by the lower colony count of *M. abscessus* when grown in a dual-species biofilm with *P. aeruginosa*.
3. The interactions that are established between both bacteria influence their response to antimicrobials. Notably, *M. abscessus* showed a drastic decrease in its susceptibility to amikacin. This, together with the increased tolerance to antimicrobials typical of the biofilm growth mode, could explain the high rate of therapeutic failure observed in patients with *M. abscessus* pulmonary disease, and highlights the importance of studying interactions between coinfecting microorganisms when evaluating antimicrobial efficacy.
4. The lack of response of *M. abscessus* to amikacin in dual-species biofilms is due to an increased tolerance, probably because of a decreased oxygen tension in the lower layers of the biofilm. This may represent a future line of research, in which the effect of antimicrobials on polymicrobial biofilms might be evaluated considering the spatial distribution of the co-infecting microorganisms.
5. Tolerance to antimicrobials in biofilms is increased with time, which emphasizes the need to establish an early treatment to prevent or delay the implementation of chronic pulmonary infection by *M. abscessus*, and highlights the importance of studying the phenotypic characteristics of biofilms in their different stages of maturation.

6. Inhibition of *M. abscessus* and *P. aeruginosa* biofilms with antimicrobials is influenced by host lung epithelial cells. Notably, *P. aeruginosa* became more susceptible to ceftazidime in single species biofilms and to colistin in dual-species biofilms, whereas the biofilm of *M. abscessus* was not induced in the presence of 3D lung epithelial cells.
7. Our results highlight the importance of studying the impact of the host microenvironment when evaluating antimicrobial activity, as well as the significance of the development of models that allow correlation between *in vitro* studies and *in vivo* outcomes in difficult-to-treat infections.
8. Antimicrobial therapy selectively targeting *P. aeruginosa* increases the survival of *M. abscessus* in dual-species biofilms in all models, probably by decreasing the competitive interaction between both species. This suggests that antimicrobial treatment directed at frequent CF pathogens, such as *P. aeruginosa*, could favor lung colonization by *M. abscessus*.



Bibliografía

1. Collins, F.S., *Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications*. Science, 1992. **256**(5058): p. 774-9.
2. Serohijos, A.W., et al., *Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(9): p. 3256-61.
3. Ratjen, F., et al., *Cystic fibrosis*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15010.
4. *Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry - 2017 Annual Data Report*, 2018, Cystic Fibrosis Foundation: Bethesda, Maryland.
5. Liu, W., et al., *Interspecific Bacterial Interactions are Reflected in Multispecies Biofilm Spatial Organization*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 1366.
6. Barrila, J., et al., *Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(11): p. 791-801.
7. Peters, B.M., et al., *Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(1): p. 193-213.
8. Lipuma, J.J., *The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(2): p. 299-323.
9. Nessar, R., et al., *Mycobacterium abscessus: a new antibiotic nightmare*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(4): p. 810-8.
10. Esther, C.R., Jr., et al., *Chronic Mycobacterium abscessus infection and lung function decline in cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2010. **9**(2): p. 117-23.
11. Qvist, T., et al., *Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2016. **15**(3): p. 380-5.
12. Floto, R.A., et al., *US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis*. Thorax, 2016. **71 Suppl 1**: p. i1-22.
13. Rommens, J.M., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1059-65.
14. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
15. Kerem, B., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1073-80.
16. Salvatore, D., et al., *An overview of international literature from cystic fibrosis registries. Part 3. Disease incidence, genotype/phenotype correlation, microbiology, pregnancy, clinical complications, lung transplantation, and miscellanea*. J Cyst Fibros, 2011. **10**(2): p. 71-85.
17. Southern, K.W., et al., *A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe*. J Cyst Fibros, 2007. **6**(1): p. 57-65.
18. Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype, C., *Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis*. N Engl J Med, 1993. **329**(18): p. 1308-13.
19. McKone, E.F., C.H. Goss, and M.L. Aitken, *CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis*. Chest, 2006. **130**(5): p. 1441-7.

20. Kreda, S.M., et al., *Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(5): p. 2154-67.
21. Bear, C.E., et al., *Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)*. Cell, 1992. **68**(4): p. 809-18.
22. Hopf, A., et al., *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits epithelial Na⁺ channels carrying Liddle's syndrome mutations*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 13894-9.
23. Mall, M., et al., *The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 15-21.
24. Clancy, J.P., *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function in Airway Smooth Muscle. A Novel Role in Cystic Fibrosis Airway Obstruction*. Am J Respir Crit Care Med, 2016. **193**(4): p. 352-3.
25. Yang, H. and T. Ma, *F508del-cystic fibrosis transmembrane regulator correctors for treatment of cystic fibrosis: a patent review*. Expert Opin Ther Pat, 2015. **25**(9): p. 991-1002.
26. Zielenski, J., *Genotype and phenotype in cystic fibrosis*. Respiration, 2000. **67**(2): p. 117-33.
27. Dorfman, R., et al., *Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 1040-9.
28. Chalmers, J.D., et al., *Impact of mannose-binding lectin insufficiency on the course of cystic fibrosis: A review and meta-analysis*. Glycobiology, 2011. **21**(3): p. 271-82.
29. Sliker, M.G., et al., *Disease modifying genes in cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2005. **4 Suppl 2**: p. 7-13.
30. Tarran, R., et al., *The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition*. J Gen Physiol, 2001. **118**(2): p. 223-36.
31. Matsui, H., et al., *Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease*. Cell, 1998. **95**(7): p. 1005-15.
32. Hoegger, M.J., et al., *Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis*. Science, 2014. **345**(6198): p. 818-22.
33. Quinton, P.M., *Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis*. Lancet, 2008. **372**(9636): p. 415-7.
34. Worlitzsch, D., et al., *Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients*. J Clin Invest, 2002. **109**(3): p. 317-25.
35. Pezzulo, A.A., et al., *Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung*. Nature, 2012. **487**(7405): p. 109-13.
36. Vandivier, R.W., et al., *Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis*. J Clin Invest, 2002. **109**(5): p. 661-70.
37. Sly, P.D., et al., *Risk factors for bronchiectasis in children with cystic fibrosis*. N Engl J Med, 2013. **368**(21): p. 1963-70.

38. O'Sullivan, B.P. and S.D. Freedman, *Cystic fibrosis*. Lancet, 2009. **373**(9678): p. 1891-904.
39. Burns, J.L. and J.M. Rolain, *Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: can we simplify the complexity?* J Cyst Fibros, 2014. **13**(1): p. 1-9.
40. Farrell, P.M., et al., *Acquisition of Pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis*. Pediatrics, 1997. **100**(5): p. E2.
41. Kidd, T.J., et al., *The social network of cystic fibrosis centre care and shared Pseudomonas aeruginosa strain infection: a cross-sectional analysis*. Lancet Respir Med, 2015. **3**(8): p. 640-50.
42. Parkins, M.D., R. Somayaji, and V.J. Waters, *Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal Pseudomonas aeruginosa Infections in Cystic Fibrosis*. Clin Microbiol Rev, 2018. **31**(4).
43. Koch, C., *Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease*. Pediatr Pulmonol, 2002. **34**(3): p. 232-6.
44. O'Toole, G.A., *Cystic Fibrosis Airway Microbiome: Overturning the Old, Opening the Way for the New*. J Bacteriol, 2018. **200**(4).
45. Malhotra, S., D. Hayes, Jr., and D.J. Wozniak, *Cystic Fibrosis and Pseudomonas aeruginosa: the Host-Microbe Interface*. Clin Microbiol Rev, 2019. **32**(3).
46. Crabbe, A., M.A. Ledesma, and C.A. Nickerson, *Mimicking the host and its microenvironment in vitro for studying mucosal infections by Pseudomonas aeruginosa*. Pathog Dis, 2014. **71**(1): p. 1-19.
47. Oliver, A., et al., *High frequency of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection*. Science, 2000. **288**(5469): p. 1251-4.
48. Ciofu, O., et al., *Occurrence of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(6): p. 2276-82.
49. Emerson, J., et al., *Pseudomonas aeruginosa and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis*. Pediatr Pulmonol, 2002. **34**(2): p. 91-100.
50. Courtney, J.M., et al., *Predictors of mortality in adults with cystic fibrosis*. Pediatr Pulmonol, 2007. **42**(6): p. 525-32.
51. Nixon, G.M., et al., *Clinical outcome after early Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis*. J Pediatr, 2001. **138**(5): p. 699-704.
52. Canton, R., et al., *Spanish consensus on the prevention and treatment of Pseudomonas aeruginosa bronchial infections in cystic fibrosis patients*. Arch Bronconeumol, 2015. **51**(3): p. 140-50.
53. Hansen, C.R., T. Pressler, and N. Hoiby, *Early aggressive eradication therapy for intermittent Pseudomonas aeruginosa airway colonization in cystic fibrosis patients: 15 years experience*. J Cyst Fibros, 2008. **7**(6): p. 523-30.
54. Canton, R., et al., *Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients*. Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(9): p. 690-703.
55. Millar, F.A., N.J. Simmonds, and M.E. Hodson, *Trends in pathogens colonising the respiratory tract of adult patients with cystic fibrosis, 1985-2005*. J Cyst Fibros, 2009. **8**(6): p. 386-91.
56. Parkins, M.D. and R.A. Floto, *Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2015. **14**(3): p. 293-304.

57. Gilligan, P.H., *Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update*. Clin Lab Med, 2014. **34**(2): p. 197-217.
58. Etherington, C., et al., *The role of respiratory viruses in adult patients with cystic fibrosis receiving intravenous antibiotics for a pulmonary exacerbation*. J Cyst Fibros, 2014. **13**(1): p. 49-55.
59. Willger, S.D., et al., *Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis*. Microbiome, 2014. **2**: p. 40.
60. Lynch, S.V. and K.D. Bruce, *The cystic fibrosis airway microbiome*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(3): p. a009738.
61. Huang, Y.J. and J.J. LiPuma, *The Microbiome in Cystic Fibrosis*. Clin Chest Med, 2016. **37**(1): p. 59-67.
62. van der Gast, C.J., et al., *Partitioning core and satellite taxa from within cystic fibrosis lung bacterial communities*. ISME J, 2011. **5**(5): p. 780-91.
63. Willner, D., et al., *Spatial distribution of microbial communities in the cystic fibrosis lung*. ISME J, 2012. **6**(2): p. 471-4.
64. Stenbit, A.E. and P.A. Flume, *Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis*. Curr Opin Pulm Med, 2011. **17**(6): p. 442-7.
65. Flume, P.A., et al., *Cystic fibrosis pulmonary guidelines: treatment of pulmonary exacerbations*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(9): p. 802-8.
66. Doring, G., et al., *Antibiotic therapy against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: a European consensus*. Eur Respir J, 2000. **16**(4): p. 749-67.
67. Zhao, J., et al., *Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(15): p. 5809-14.
68. Coburn, B., et al., *Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 10241.
69. Bjarnsholt, T., et al., *Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients*. Pediatr Pulmonol, 2009. **44**(6): p. 547-58.
70. Rudkjobing, V.B., et al., *The microorganisms in chronically infected end-stage and non-end-stage cystic fibrosis patients*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012. **65**(2): p. 236-44.
71. Conrad, D., et al., *Cystic fibrosis therapy: a community ecology perspective*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013. **48**(2): p. 150-6.
72. Runyon, E.H., *Anonymous mycobacteria in pulmonary disease*. Med Clin North Am, 1959. **43**(1): p. 273-90.
73. van Ingen, J., et al., *Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(10): p. 888-93.
74. Wallace, R.J., Jr., B.A. Brown, and D.E. Griffith, *Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria*. Annu Rev Microbiol, 1998. **52**: p. 453-90.
75. Cheng, A., et al., *Extrapulmonary infections caused by a dominant strain of Mycobacterium massiliense (Mycobacterium abscessus subspecies bolletii)*. Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(10): p. E473-82.
76. Cheng, A., et al., *Prolonged postprocedural outbreak of Mycobacterium massiliense infections associated with ultrasound transmission gel*. Clin Microbiol Infect, 2016. **22**(4): p. 382 e1-382 e11.

77. Adekambi, T., et al., *Reinstating Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii as species of the Mycobacterium abscessus complex*. Int J Syst Evol Microbiol, 2017. **67**(8): p. 2726-2730.
78. Lee, M.R., et al., *Mycobacterium abscessus Complex Infections in Humans*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(9): p. 1638-46.
79. Ripoll, F., et al., *Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5660.
80. Qvist, T., et al., *Chronic pulmonary disease with Mycobacterium abscessus complex is a biofilm infection*. Eur Respir J, 2015. **46**(6): p. 1823-6.
81. Ryan, K. and T.F. Byrd, *Mycobacterium abscessus: Shapeshifter of the Mycobacterial World*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2642.
82. Luengo, J.M., J.L. Garcia, and E.R. Olivera, *The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications*. Mol Microbiol, 2001. **39**(6): p. 1434-42.
83. Brown-Elliott, B.A. and R.J. Wallace, Jr., *Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(4): p. 716-46.
84. Jeon, K., et al., *Antibiotic treatment of Mycobacterium abscessus lung disease: a retrospective analysis of 65 patients*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(9): p. 896-902.
85. Hurst-Hess, K., P. Rudra, and P. Ghosh, *Mycobacterium abscessus WhiB7 Regulates a Species-Specific Repertoire of Genes To Confer Extreme Antibiotic Resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(11).
86. Bastian, S., et al., *Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the Mycobacterium abscessus group by erm(41) and rrl sequencing*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(2): p. 775-81.
87. Kim, H.Y., et al., *Mycobacterium massiliense is differentiated from Mycobacterium abscessus and Mycobacterium bolletii by erythromycin ribosome methyltransferase gene (erm) and clarithromycin susceptibility patterns*. Microbiol Immunol, 2010. **54**(6): p. 347-53.
88. Nash, K.A., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, Jr., *A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of Mycobacterium abscessus but is absent from Mycobacterium chelonae*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(4): p. 1367-76.
89. Koh, W.J., et al., *Clinical significance of differentiation of Mycobacterium massiliense from Mycobacterium abscessus*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(3): p. 405-10.
90. Martin, C., et al., *Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria*. Nature, 1990. **345**(6277): p. 739-43.
91. Bar-On, O., et al., *Increasing nontuberculous mycobacteria infection in cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2015. **14**(1): p. 53-62.
92. Bryant, J.M., et al., *Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium*. Science, 2016. **354**(6313): p. 751-757.
93. Catherinot, E., et al., *Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus complex target distinct cystic fibrosis patient subpopulations*. J Cyst Fibros, 2013. **12**(1): p. 74-80.

94. Roux, A.L., et al., *Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in france*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(12): p. 4124-8.
95. Rodman, D.M., et al., *Late diagnosis defines a unique population of long-term survivors of cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(6): p. 621-6.
96. Adjemian, J., et al., *Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **185**(8): p. 881-6.
97. Olivier, K.N., et al., *Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(6): p. 828-34.
98. Levy, I., et al., *Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(3): p. 378-84.
99. Pierre-Audigier, C., et al., *Age-related prevalence and distribution of nontuberculous mycobacterial species among patients with cystic fibrosis*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(7): p. 3467-70.
100. Qvist, T., et al., *Shifting paradigms of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis*. Respir Res, 2014. **15**: p. 41.
101. Thomson, R., et al., *Isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from household water and shower aerosols in patients with pulmonary disease caused by NTM*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(9): p. 3006-11.
102. Feazel, L.M., et al., *Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(38): p. 16393-9.
103. Gebert, M.J., et al., *Ecological Analyses of Mycobacteria in Showerhead Biofilms and Their Relevance to Human Health*. MBio, 2018. **9**(5).
104. Eikani, M.S., et al., *Clinical course and significance of nontuberculous mycobacteria and its subtypes in cystic fibrosis*. BMC Infect Dis, 2018. **18**(1): p. 311.
105. Bouso, J.M., et al., *Household proximity to water and nontuberculous mycobacteria in children with cystic fibrosis*. Pediatr Pulmonol, 2017. **52**(3): p. 324-330.
106. Bryant, J.M., et al., *Whole-genome sequencing to identify transmission of Mycobacterium abscessus between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study*. Lancet, 2013. **381**(9877): p. 1551-60.
107. Viviani, L., et al., *Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) amongst individuals with cystic fibrosis (CF)*. J Cyst Fibros, 2016. **15**(5): p. 619-23.
108. Renna, M., et al., *Azithromycin blocks autophagy and may predispose cystic fibrosis patients to mycobacterial infection*. J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3554-63.
109. Falkinham, J.O., 3rd, *Current Epidemiologic Trends of the Nontuberculous Mycobacteria (NTM)*. Curr Environ Health Rep, 2016. **3**(2): p. 161-7.
110. Mussaffi, H., et al., *Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis and steroid therapy*. Eur Respir J, 2005. **25**(2): p. 324-8.
111. Griffith, D.E., et al., *An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(4): p. 367-416.
112. CLSI, *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard - Second edition*. CLSI document M24-A42, 2011.

113. Jarand, J., et al., *Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for Mycobacterium abscessus pulmonary disease*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(5): p. 565-71.
114. Koh, W.J., et al., *Mycobacterial Characteristics and Treatment Outcomes in Mycobacterium abscessus Lung Disease*. Clin Infect Dis, 2017. **64**(3): p. 309-316.
115. Ballarino, G.J., et al., *Pulmonary nontuberculous mycobacterial infections: antibiotic treatment and associated costs*. Respir Med, 2009. **103**(10): p. 1448-55.
116. Strollo, S.E., et al., *The Burden of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease in the United States*. Ann Am Thorac Soc, 2015. **12**(10): p. 1458-64.
117. Smith, A.L., et al., *Susceptibility testing of Pseudomonas aeruginosa isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration: lack of association in cystic fibrosis*. Chest, 2003. **123**(5): p. 1495-502.
118. Hurley, M.N., et al., *Results of antibiotic susceptibility testing do not influence clinical outcome in children with cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2012. **11**(4): p. 288-92.
119. Hughes, D. and D.I. Andersson, *Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance*. FEMS Microbiol Rev, 2017. **41**(3): p. 374-391.
120. Doring, G., et al., *Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies*. J Cyst Fibros, 2012. **11**(6): p. 461-79.
121. Rogers, G.B., L.R. Hoffman, and G. Doring, *Novel concepts in evaluating antimicrobial therapy for bacterial lung infections in patients with cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2011. **10**(6): p. 387-400.
122. Foweraker, J.E., et al., *Comparison of methods to test antibiotic combinations against heterogeneous populations of multiresistant Pseudomonas aeruginosa from patients with acute infective exacerbations in cystic fibrosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(11): p. 4809-15.
123. Li, J., et al., *Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 364.
124. Radlinski, L. and B.P. Conlon, *Antibiotic efficacy in the complex infection environment*. Curr Opin Microbiol, 2018. **42**: p. 19-24.
125. Martinez, J.L. and F. Rojo, *Metabolic regulation of antibiotic resistance*. FEMS Microbiol Rev, 2011. **35**(5): p. 768-89.
126. Kubicek-Sutherland, J.Z., et al., *Host-dependent Induction of Transient Antibiotic Resistance: A Prelude to Treatment Failure*. EBioMedicine, 2015. **2**(9): p. 1169-78.
127. Roberts, A.E., et al., *The Limitations of In Vitro Experimentation in Understanding Biofilms and Chronic Infection*. J Mol Biol, 2015. **427**(23): p. 3646-61.
128. Hoiby, N., O. Ciofu, and T. Bjarnsholt, *Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis*. Future Microbiol, 2010. **5**(11): p. 1663-74.
129. Berne, C., et al., *Bacterial adhesion at the single-cell level*. Nat Rev Microbiol, 2018. **16**(10): p. 616-627.
130. Flemming, H.C. and J. Wingender, *The biofilm matrix*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(9): p. 623-33.
131. Hall-Stoodley, L., et al., *Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012. **65**(2): p. 127-45.

132. Vert, M., et al., *Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)*. Pure Appl. Chem., 2012. **842**(2): p. 377-410.
133. de Beer, D., et al., *Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport*. Biotechnol Bioeng, 1994. **43**(11): p. 1131-8.
134. Abisado, R.G., et al., *Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions*. MBio, 2018. **9**(3).
135. Stoodley, P., et al., *Biofilms as complex differentiated communities*. Annu Rev Microbiol, 2002. **56**: p. 187-209.
136. Joo, H.S. and M. Otto, *Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens*. Chem Biol, 2012. **19**(12): p. 1503-13.
137. Costerton, J.W., et al., *Microbial biofilms*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 711-45.
138. Potera, C., *Studying slime*. Environ Health Perspect, 1998. **106**(12): p. A604-6.
139. Burmolle, M., et al., *Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **59**(3): p. 324-36.
140. Beyenal, H. and J. Babauta, *Microsensors and microscale gradients in biofilms*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2014. **146**: p. 235-56.
141. Stewart, P.S. and M.J. Franklin, *Physiological heterogeneity in biofilms*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(3): p. 199-210.
142. Oliver, J.D., *Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria*. FEMS Microbiol Rev, 2010. **34**(4): p. 415-25.
143. Ayrapetyan, M., T.C. Williams, and J.D. Oliver, *Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria*. Trends Microbiol, 2015. **23**(1): p. 7-13.
144. Ayrapetyan, M., T. Williams, and J.D. Oliver, *Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells*. J Bacteriol, 2018. **200**(20).
145. Roder, H.L., S.J. Sorensen, and M. Burmolle, *Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start?* Trends Microbiol, 2016. **24**(6): p. 503-513.
146. Elias, S. and E. Banin, *Multi-species biofilms: living with friendly neighbors*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(5): p. 990-1004.
147. Ceri, H., et al., *The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(6): p. 1771-6.
148. Motta, S.S., P. Cluzel, and M. Aldana, *Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0118464.
149. Mulcahy, H., L. Charron-Mazenod, and S. Lewenza, *Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000213.
150. Jefferson, K.K., D.A. Goldmann, and G.B. Pier, *Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through Staphylococcus aureus biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(6): p. 2467-73.
151. Nichols, W.W., et al., *Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate*. Antimicrob Agents Chemother, 1988. **32**(4): p. 518-23.

152. Kumon, H., et al., *A sandwich cup method for the penetration assay of antimicrobial agents through Pseudomonas exopolysaccharides*. Microbiol Immunol, 1994. **38**(8): p. 615-9.
153. Borriello, G., et al., *Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of Pseudomonas aeruginosa in biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(7): p. 2659-64.
154. Walters, M.C., 3rd, et al., *Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of Pseudomonas aeruginosa biofilms to ciprofloxacin and tobramycin*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(1): p. 317-23.
155. Schlessinger, D., *Failure of aminoglycoside antibiotics to kill anaerobic, low-pH, and resistant cultures*. Clin Microbiol Rev, 1988. **1**(1): p. 54-9.
156. Brooun, A., S. Liu, and K. Lewis, *A dose-response study of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(3): p. 640-6.
157. Pamp, S.J., et al., *Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in Pseudomonas aeruginosa biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes*. Mol Microbiol, 2008. **68**(1): p. 223-40.
158. Kvist, M., V. Hancock, and P. Klemm, *Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(23): p. 7376-82.
159. Zhang, L. and T.F. Mah, *Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics*. J Bacteriol, 2008. **190**(13): p. 4447-52.
160. Kim, J., et al., *Tolerance of dormant and active cells in Pseudomonas aeruginosa PA01 biofilm to antimicrobial agents*. J Antimicrob Chemother, 2009. **63**(1): p. 129-35.
161. Tanaka, G., et al., *Effect of the growth rate of Pseudomonas aeruginosa biofilms on the susceptibility to antimicrobial agents: beta-lactams and fluoroquinolones*. Chemotherapy, 1999. **45**(1): p. 28-36.
162. Jayaraman, R., *Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon*. J Biosci, 2008. **33**(5): p. 795-805.
163. Ayrapetyan, M., et al., *Viable but Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum*. Infect Immun, 2015. **83**(11): p. 4194-203.
164. Allison, K.R., M.P. Brynildsen, and J.J. Collins, *Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides*. Nature, 2011. **473**(7346): p. 216-20.
165. Conlon, B.P., S.E. Rowe, and K. Lewis, *Persister cells in biofilm associated infections*. Adv Exp Med Biol, 2015. **831**: p. 1-9.
166. Olsen, I., et al., *Bacterial sex in dental plaque*. J Oral Microbiol, 2013. **5**.
167. Driffield, K., et al., *Increased mutability of Pseudomonas aeruginosa in biofilms*. J Antimicrob Chemother, 2008. **61**(5): p. 1053-6.
168. Macia, M.D., et al., *Dynamics of mutator and antibiotic-resistant populations in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model of Pseudomonas aeruginosa biofilm treatment*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(11): p. 5230-7.
169. Lewis, K., *Persister cells, dormancy and infectious disease*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(1): p. 48-56.
170. Lewis, K., *Riddle of biofilm resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(4): p. 999-1007.

171. Filkins, L.M. and G.A. O'Toole, *Cystic Fibrosis Lung Infections: Polymicrobial, Complex, and Hard to Treat*. PLoS Pathog, 2015. **11**(12): p. e1005258.
172. Stacy, A., et al., *The biogeography of polymicrobial infection*. Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(2): p. 93-105.
173. O'Brien, S. and J.L. Fothergill, *The role of multispecies social interactions in shaping Pseudomonas aeruginosa pathogenicity in the cystic fibrosis lung*. FEMS Microbiol Lett, 2017. **364**(15).
174. Tavernier, S., et al., *Community Composition Determines Activity of Antibiotics against Multispecies Biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(9).
175. Tavernier, S., et al., *Decreased susceptibility of Streptococcus anginosus to vancomycin in a multispecies biofilm is due to increased thickness of the cell wall*. J Antimicrob Chemother, 2018. **73**(9): p. 2323-2330.
176. Orazi, G. and G.A. O'Toole, *Pseudomonas aeruginosa Alters Staphylococcus aureus Sensitivity to Vancomycin in a Biofilm Model of Cystic Fibrosis Infection*. mBio, 2017. **8**(4).
177. Manavathu, E.K., D.L. Vager, and J.A. Vazquez, *Development and antimicrobial susceptibility studies of in vitro monomicrobial and polymicrobial biofilm models with Aspergillus fumigatus and Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiol, 2014. **14**: p. 53.
178. Lopes, S.P., et al., *Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection*. Int J Antimicrob Agents, 2012. **40**(3): p. 260-3.
179. Brook, I., *Direct and indirect pathogenicity of beta-lactamase-producing bacteria in mixed infections in children*. Crit Rev Microbiol, 1989. **16**(3): p. 161-80.
180. Maddocks, J.L. and J.R. May, *"Indirect pathogenicity" of penicillinase-producing enterobacteria in chronic bronchial infections*. Lancet, 1969. **1**(7599): p. 793-5.
181. Armbruster, C.E., et al., *Indirect pathogenicity of Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis in polymicrobial otitis media occurs via interspecies quorum signaling*. MBio, 2010. **1**(3).
182. Perez, A.C., et al., *Residence of Streptococcus pneumoniae and Moraxella catarrhalis within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence in vivo*. Pathog Dis, 2014. **70**(3): p. 280-8.
183. Adam, B., G.S. Baillie, and L.J. Douglas, *Mixed species biofilms of Candida albicans and Staphylococcus epidermidis*. J Med Microbiol, 2002. **51**(4): p. 344-9.
184. Pompilio, A., et al., *Cooperative pathogenicity in cystic fibrosis: Stenotrophomonas maltophilia modulates Pseudomonas aeruginosa virulence in mixed biofilm*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 951.
185. Tognon, M., et al., *Co-evolution with Staphylococcus aureus leads to lipopolysaccharide alterations in Pseudomonas aeruginosa*. ISME J, 2017. **11**(10): p. 2233-2243.
186. Hoffman, L.R., et al., *Selection for Staphylococcus aureus small-colony variants due to growth in the presence of Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(52): p. 19890-5.
187. Radlinski, L., et al., *Pseudomonas aeruginosa exoproducts determine antibiotic efficacy against Staphylococcus aureus*. PLoS Biol, 2017. **15**(11): p. e2003981.

188. Bhargava, N., P. Sharma, and N. Capalash, *Pyocyanin stimulates quorum sensing-mediated tolerance to oxidative stress and increases persister cell populations in Acinetobacter baumannii*. Infect Immun, 2014. **82**(8): p. 3417-25.
189. Weigel, L.M., et al., *High-level vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates associated with a polymicrobial biofilm*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(1): p. 231-8.
190. Hannan, S., et al., *Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **59**(3): p. 345-9.
191. Ready, D., et al., *Potential role of Veillonella spp. as a reservoir of transferable tetracycline resistance in the oral cavity*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(8): p. 2866-8.
192. Tanner, W.D., et al., *Horizontal transfer of the blaNDM-1 gene to Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii in biofilms*. FEMS Microbiol Lett, 2017. **364**(8).
193. Unsworth, B.R. and P.I. Leikes, *Growing tissues in microgravity*. Nat Med, 1998. **4**(8): p. 901-7.
194. Crabbe, A., et al., *Alveolar epithelium protects macrophages from quorum sensing-induced cytotoxicity in a three-dimensional co-culture model*. Cell Microbiol, 2011. **13**(3): p. 469-81.
195. Carterson, A.J., et al., *A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: alternative tissue culture model for Pseudomonas aeruginosa pathogenesis*. Infect Immun, 2005. **73**(2): p. 1129-40.
196. Nickerson, C.A., et al., *Three-dimensional tissue assemblies: novel models for the study of Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenesis*. Infect Immun, 2001. **69**(11): p. 7106-20.
197. David, J., N.M. Sayer, and M. Sarkar-Tyson, *The use of a three-dimensional cell culture model to investigate host-pathogen interactions of Francisella tularensis in human lung epithelial cells*. Microbes Infect, 2014. **16**(9): p. 735-45.
198. Radtke, A.L. and M.M. Herbst-Kralovetz, *Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models*. J Vis Exp, 2012(62).
199. Barrila, J., et al., *Modeling Host-Pathogen Interactions in the Context of the Microenvironment: Three-Dimensional Cell Culture Comes of Age*. Infect Immun, 2018. **86**(11).
200. Crabbe, A., et al., *Host metabolites stimulate the bacterial proton motive force to enhance the activity of aminoglycoside antibiotics*. PLoS Pathog, 2019. **15**(4): p. e1007697.
201. Crabbe, A., et al., *Antimicrobial efficacy against Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in a three-dimensional lung epithelial model and the influence of fetal bovine serum*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 43321.
202. Stoltz, D.A., D.K. Meyerholz, and M.J. Welsh, *Origins of cystic fibrosis lung disease*. N Engl J Med, 2015. **372**(4): p. 351-62.
203. Sibley, C.D., H. Rabin, and M.G. Surette, *Cystic fibrosis: a polymicrobial infectious disease*. Future Microbiol, 2006. **1**(1): p. 53-61.

204. Binder, A.M., et al., *Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infections and associated chronic macrolide use among persons with cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(7): p. 807-12.
205. Adjemian, J., K.N. Olivier, and D.R. Prevots, *Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Sputum Positivity in Patients with Cystic Fibrosis in the United States, 2010-2014*. Ann Am Thorac Soc, 2018. **15**(7): p. 817-826.
206. Birmes, F.S., et al., *Mycobacterium abscessus subsp. abscessus Is Capable of Degrading Pseudomonas aeruginosa Quinolone Signals*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 339.
207. Birmes, F.S., et al., *Interference with Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing and Virulence by the Mycobacterial Pseudomonas Quinolone Signal Dioxygenase AqdC in Combination with the N-Acylhomoserine Lactone Lactonase QsdA*. Infect Immun, 2019. **87**(10).
208. Singla, S., K. Harjai, and S. Chhibber, *Artificial Klebsiella pneumoniae biofilm model mimicking in vivo system: altered morphological characteristics and antibiotic resistance*. J Antibiot (Tokyo), 2014. **67**(4): p. 305-9.
209. Estrela, S. and S.P. Brown, *Metabolic and demographic feedbacks shape the emergent spatial structure and function of microbial communities*. PLoS Comput Biol, 2013. **9**(12): p. e1003398.
210. An, D., et al., *Quorum sensing and motility mediate interactions between Pseudomonas aeruginosa and Agrobacterium tumefaciens in biofilm cocultures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3828-33.
211. De Groote, M.A. and G. Huitt, *Infections due to rapidly growing mycobacteria*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(12): p. 1756-63.
212. Brown-Elliott B, W.R., *Mycobacterium: Clinical and Laboratory Characteristics of Rapidly Growing Mycobacteria*, in *Manual of Clinical Microbiology*. 2011: Washington, DC. p. 525-538.
213. Dunne, W.M., Jr., *Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?* Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 155-66.
214. Donlan, R.M., *Biofilms: microbial life on surfaces*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(9): p. 881-90.
215. Finlay, B.B. and S. Falkow, *Common themes in microbial pathogenicity*. Microbiol Rev, 1989. **53**(2): p. 210-30.
216. Mullis, S.N. and J.O. Falkinham, 3rd, *Adherence and biofilm formation of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare and Mycobacterium abscessus to household plumbing materials*. J Appl Microbiol, 2013. **115**(3): p. 908-14.
217. Falkinham, J.O., 3rd, *Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment*. J Appl Microbiol, 2009. **107**(2): p. 356-67.
218. Esteban, J. and M. Garcia-Coca, *Mycobacterium Biofilms*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 2651.
219. Vess, R.W., et al., *The colonization of solid PVC surfaces and the acquisition of resistance to germicides by water micro-organisms*. J Appl Bacteriol, 1993. **74**(2): p. 215-21.
220. Zamora, N., et al., *In-vitro evaluation of the adhesion to polypropylene sutures of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(9): p. 902-7.

221. Conrad, J.C., et al., *Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in P. aeruginosa*. Biophys J, 2011. **100**(7): p. 1608-16.
222. Bucior, I., J.F. Pielage, and J.N. Engel, *Pseudomonas aeruginosa pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): p. e1002616.
223. Howard, S.T., et al., *Spontaneous reversion of Mycobacterium abscessus from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 6): p. 1581-90.
224. Schorey, J.S. and L. Sweet, *The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis*. Glycobiology, 2008. **18**(11): p. 832-41.
225. Esteban, J., et al., *Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria*. BMC Microbiol, 2008. **8**: p. 184.
226. Rendueles, O. and J.M. Ghigo, *Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(5): p. 972-89.
227. Wu, M.L., et al., *NTM drug discovery: status, gaps and the way forward*. Drug Discov Today, 2018. **23**(8): p. 1502-1519.
228. Fennelly, K.P., et al., *Biofilm Formation by Mycobacterium abscessus in a Lung Cavity*. Am J Respir Crit Care Med, 2016. **193**(6): p. 692-3.
229. Olsen, I., *Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015. **34**(5): p. 877-86.
230. Bjarnsholt, T., et al., *Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed?* Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(10): p. 791-808.
231. Crabbe, A., et al., *Antimicrobial Tolerance and Metabolic Adaptations in Microbial Biofilms*. Trends Microbiol, 2019. **27**(10): p. 850-863.
232. Ortiz-Perez, A., et al., *Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2011. **29**(2): p. 79-84.
233. Greendyke, R. and T.F. Byrd, *Differential antibiotic susceptibility of Mycobacterium abscessus variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(6): p. 2019-26.
234. Hunt-Serracin, A.C., et al., *Mycobacterium abscessus Cells Have Altered Antibiotic Tolerance and Surface Glycolipids in Artificial Cystic Fibrosis Sputum Medium*. Antimicrob Agents Chemother, 2019. **63**(7).
235. Clary, G., et al., *Mycobacterium abscessus Smooth and Rough Morphotypes Form Antimicrobial-Tolerant Biofilm Phenotypes but Are Killed by Acetic Acid*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(3).
236. Flores, V.D., et al., *Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis*. Microb Pathog, 2016. **99**: p. 229-235.
237. Dick, T., B.H. Lee, and B. Murugasu-Oei, *Oxygen depletion induced dormancy in Mycobacterium smegmatis*. FEMS Microbiol Lett, 1998. **163**(2): p. 159-64.
238. Wayne, L.G., *Dormancy of Mycobacterium tuberculosis and latency of disease*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1994. **13**(11): p. 908-14.

239. Miranda-CasoLuengo, A.A., et al., *Functional characterization of the Mycobacterium abscessus genome coupled with condition specific transcriptomics reveals conserved molecular strategies for host adaptation and persistence*. BMC Genomics, 2016. **17**: p. 553.
240. Kolpen, M., et al., *Biofilms of Mycobacterium abscessus Complex Can Be Sensitized to Antibiotics by Disaggregation and Oxygenation*. Antimicrob Agents Chemother, 2020. **64**(2).
241. Vandeplasseche, E., et al., *Influence of the lung microbiome on antibiotic susceptibility of cystic fibrosis pathogens*. Eur Respir Rev, 2019. **28**(152).
242. Colvin, K.M., et al., *The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog, 2011. **7**(1): p. e1001264.
243. Billings, N., et al., *The extracellular matrix Component Psl provides fast-acting antibiotic defense in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. PLoS Pathog, 2013. **9**(8): p. e1003526.
244. Kaplan, J.B., *Antibiotic-induced biofilm formation*. Int J Artif Organs, 2011. **34**(9): p. 737-51.
245. Nickerson, C.A., E.G. Richter, and C.M. Ott, *Studying host-pathogen interactions in 3-D: organotypic models for infectious disease and drug development*. J Neuroimmune Pharmacol, 2007. **2**(1): p. 26-31.
246. Bals, R., *Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection*. Respir Res, 2000. **1**(3): p. 141-50.
247. Carryn, S., et al., *Intracellular pharmacodynamics of antibiotics*. Infect Dis Clin North Am, 2003. **17**(3): p. 615-34.
248. Cantón, R., et al., *Spanish Consensus on the Prevention and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Bronchial Infections in Cystic Fibrosis Patients*. Archivos de Bronconeumología, 2015. **51**(3): p. 140-150.
249. Langton Hower, S.C. and A.R. Smyth, *Antibiotic strategies for eradicating Pseudomonas aeruginosa in people with cystic fibrosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. **4**: p. CD004197.